Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von
E. Buchner-Würzburg, F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. v. Noorden-Frankfurt a. M., E. Salkowski-Berlin, F. Tangl-Budapest, A. von Wassermann-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von
M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, J. Bang-Lund, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, E. Friedberger-Greifswald, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galeotti-Neapel, F. Haber-Berlin-Dahlem, H. J. Hamburger-Groningen, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, V. Henriques-Kopenhagen, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, R. Kobert-Rostock, M. Kumagawa-Tokio, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Berlin, L. Michaelis-Berlin, J. Morgenroth-Berlin, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, F. Roehmann-Breslau, P. Rona-Berlin, S. Salaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, M. Siegfried-Leipzig, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Straßburg, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-Freiburg i. B., A. Stutzer-Königsberg i. Pr., H. v. Tappeiner-München, H. Thoms-Berlin, A. J. J. Vandevelde-Gent, O. Warburg-Berlin, W. Wiechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

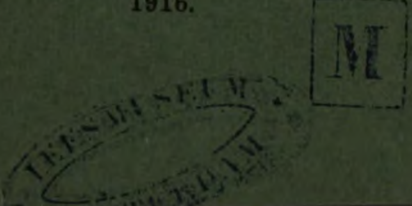
Redigiert von
C. Neuberg-Berlin.

Fünfundsiebzigster Band.

1916.



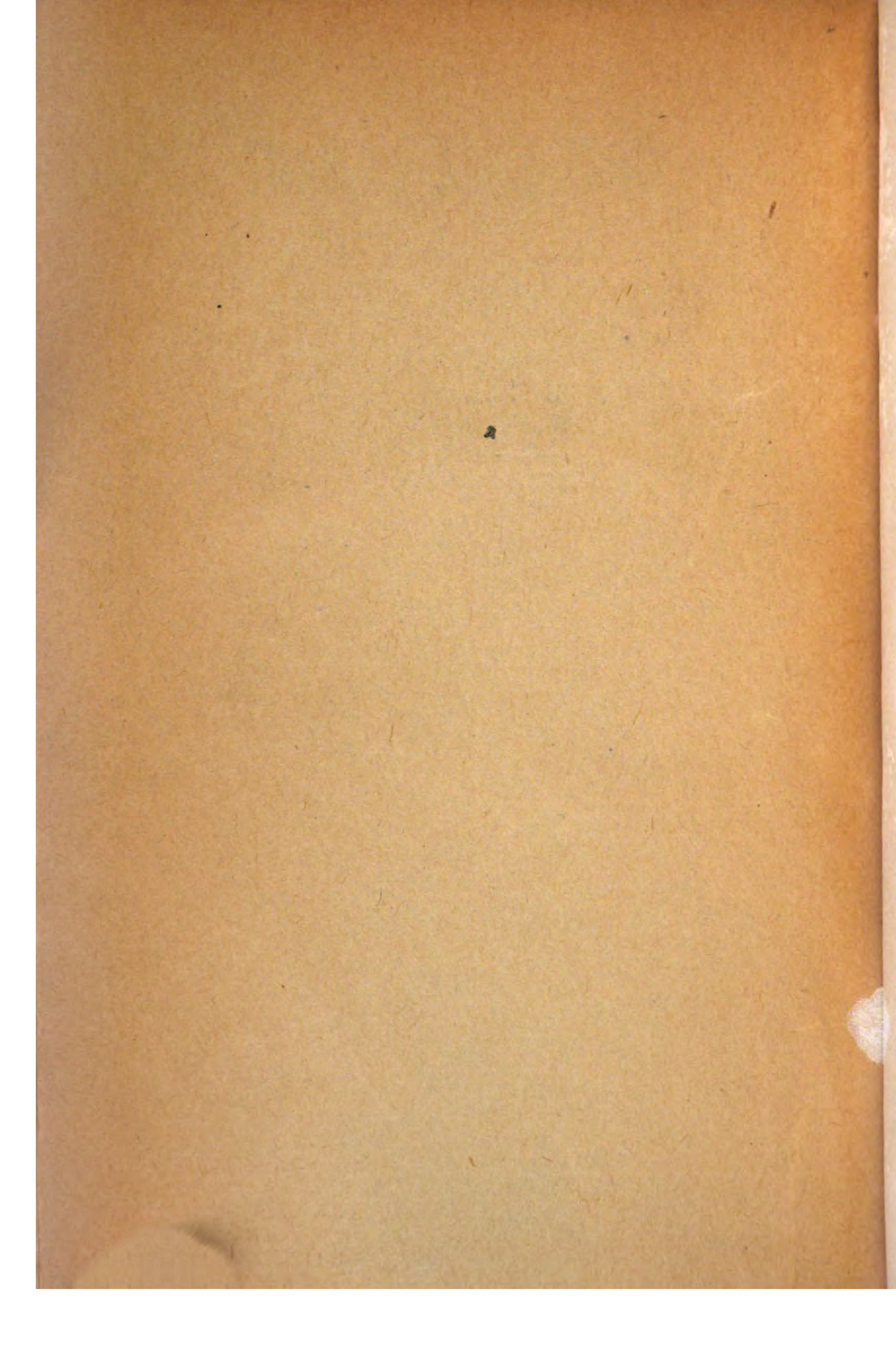
Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1916.








F.G.KOSTER · BOEKBINDER



Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

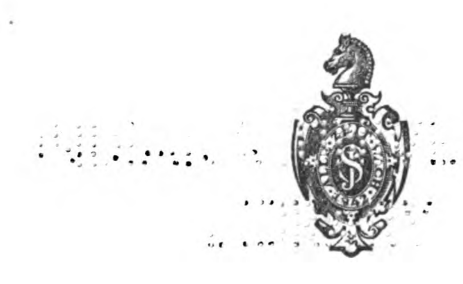
E. Buchner-Würzburg, F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. v. Noorden-Frankfurt a. M., E. Salkowski-Berlin, F. Tangl-Budapest, A. von Wassermann-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Fünfundsiebzigster Band.



Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1916.



Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Einige Beobachtungen über die Bedeutung der Lipoide für die Blutgerinnung.

Von

Adolf Herrmannsdorfer.

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität München
[Direktor: Prof. Dr. M. Borst].)

(Eingegangen am 17. März 1916.)

A. Einleitung.

1. Die Lehre von der Blutgerinnung und die gerinnungsfördernden Substanzen der Gewebe.

Unsere Anschauungen vom Wesen des Blutgerinnungsvorganges sind trotz der gewaltigen Anstrengungen, die zur Klärung dieser Frage besonders seit etwa Mitte des 19. Jahrhunderts gemacht worden sind, noch keineswegs endgültige[1]).

Wenn auch bis zum Jahre 1860 Denis[2]) schon eine Vorstufe des Fibrins in der Form des Serofibrins oder Plasmins dargestellt, Brücke[3]) die Tatsache der gerinnungshemmenden Eigenschaft der Gefäßwand gefunden und Buchanan[4]) festgestellt hatte, daß außer dem Fibrinogen, der Vorstufe des Fibrins, noch ein zweiter Gerinnungskörper, der im Serum enthalten ist, zur Gerinnung nötig sei, so gilt doch als eigentlicher Begründer der heutigen Anschauungen Alexander Schmidt. In zahlreichen Untersuchungen tat Schmidt dar, daß es sich bei der Blutgerinnung um einen fermentativen Vorgang handele. Sein Verdienst

---

[1]) Zusammenfassende Darstellung mit Angabe der bis 1905 erschienenen Literatur findet sich in den Ergebnissen d. Physiol. 4. Jahrg. 1905, 1. und 2. Abt. S. 307ff., Paul Morawitz, „Die Chemie der Blutgerinnung"; siehe ferner Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden von Abderhalden 5 1, 223ff., 1911, P. Morawitz, „Die Blutgerinnung", sodann Oppenheimers Handb. d. Biochemie 2 2, 40ff., 1909, P. Morawitz, „Die Gerinnung des Blutes".

[2]) Denis, Nouvelles études chimiques, physiol. et médic. sur les substances albuminoïdes, Paris 1856. — Mémoire sur le sang, Paris 1859.

[3]) Brücke, Über die Ursache der Gerinnung des Blutes. Virchows Archiv 12, 100ff., 1857.

[4]) Buchanan, On the Coagulat. of the Blood and other fibriniferous Liquids. 1845. Proc. of the Philos. Soc. of Glasgow. II, S. 1844 bis 1848.

ist es auch, nachdrücklich auf die Bedeutung hingewiesen zu haben, die den Blutzellen für den Koagulationsprozeß zuzuerkennen sei. Mannigfach modifiziert und ergänzt wurde die Lehre Schmidts dann in der Folgezeit unter anderen besonders durch Arthus und Pagès[1]), ferner durch Hammarsten[2]) und Pekelharing[3]). Diese Forscher fanden und betonten besonders die Unentbehrlichkeit der Kalksalze bei der Blutgerinnung.

Schon Schmidt hatte darauf hingewiesen, daß das Fibrinferment (Thrombin), um in Wirksamkeit zu treten, der Aktivierung durch sogenannte zymoplastische Substanzen bedürfe. Während das Prothrombin, die Vorstufe des Fermentes, im Blutplasma zirkuliere, seien diese Aktivatoren in den Zellen, oder ganz allgemein, im Protoplasma überhaupt vorhanden. Durch Alkoholextraktion könne man diese hitzebeständigen, chemisch nicht einheitlichen Stoffe aus den Geweben gewinnen[4]). Bereits vor ihm hatte Rauschenbach[5]) die Existenz einer Vorstufe des Fermentes in den Geweben, besonders den nucleinreichen, behauptet und ihr den Namen Protozym gegeben. Schmidt wich von dieser Ansicht insofern ab, als er die eigentliche Fermentvorstufe als Prothrombin im Plasma annahm und den zymoplastischen Gewebsbestandteilen kinetische Funktion für das Proferment zusprach. Die Bedeutung der Gewebsextrakte für die Gerinnung wurde dann in Zukunft allgemein anerkannt und versucht, die chemische Konstitution der wirksamen Komponente festzulegen. Pekelharing[6]) glaubt, sie als Nucleoproteide ansprechen zu müssen. Nach ihm sollen diese eiweißartigen Substanzen durch Zusammentritt mit den Blutkalksalzen das Fibrinferment liefern. Nach Halliburton[7]) ist das gerinnungauslösende Prinzip der Gewebssäfte ein Globulin mit Fermentcharakter. Später trat er der Ansicht von Pekelharing bei[8]). Der Erforschung der zymoplastischen Faktoren widmeten sich dann besonders auch Fuld und

---

[1]) Arthus und Pagès, Nouvelle théorie chimique de la coagulation du sang. Arch. de Physiol. 22, 739 bis 746, 1890.

[2]) Hammarsten, Über d. Bedeutung d. löslichen Kalksalze usw. Zeitschr. f. physiol. Chem. 22 und 27.

[3]) C. A. Pekelharing, Über d. Bedeutung d. Kalksalze f. d. Gerinnung. Beiträge für R. Virchows Festschrift I, 1891.

[4]) A. Schmidt, Zur Blutlehre, Leipzig 1892; Weitere Beiträge zur Blutlehre, Wiesbaden 1895.

[5]) Rauschenbach, Über die Wechselwirkungen zwischen Protoplasma u. Blutplasma. Inaug.-Diss. Dorpat 1883.

[6]) C. A. Pekelharing, Ein paar Bemerkungen über Fibrinferment. Diese Zeitschr. **11**, 1 bis 11, 1908.

[7]) Halliburton, Über d. Gerinnung d. Blutes. Proc. roy. Soc. **44**, 225 bis 268, 1888; Über d. Natur d. Fibrinfermentes. Journ. of physiol. **9**, 229f.

[8]) Halliburton, Nucleoproteide. Journ. of physiol. **18**, 306f., 1895.

Spiro[1]) und Morawitz[2]). Dieser stellte fest, daß man durch Extraktion mit Kochsalzlösung aus allen, vornehmlich aber aus den nucleinreichen Geweben (Thymus, Lymphdrüsen usw.) stark gerinnungsfördernde Säfte erhält. Die wirksamen Bestandteile sind nicht alkohollöslich, gehen beim Erwärmen auf 70° C zugrunde, sind sehr labil und daher schwer in Trockne zu gewinnen[3]). Morawitz führte für diese Stoffe, die chemisch nicht näher charakterisiert sind, den Namen Thrombokinase ein und gab in Übereinstimmung mit Fuld und Spiro der fermentativen Auffassung der Blutgerinnung die allgemein bekannte und heute wohl am meisten anerkannte Form.

Schon frühzeitig wurde die Fermentnatur des Gerinnungsvorganges jedoch angezweifelt. Schmidt selbst ließ sich dazu eine zeitlang bestimmen. Freund[4]) versuchte den Koagulationsprozeß folgendermaßen rein chemisch zu erklären, ohne allerdings damit Anklang zu finden. Aus den durch Adhäsion geschädigten roten Blutkörperchen sollen Phosphate austreten, die mit den Kalksalzen des Blutplasmas einen Niederschlag ergeben und so das Fibrin mechanisch mitreißen. Auch Lilienfeld[5]) leugnete den Fermentcharakter des Vorganges. Nach ihm kommt die Gerinnung durch ein Spaltprodukt der in den Blutplättchen und Leukocyten enthaltenen Nucleoproteide zustande. Dieses, Leukonuclein genannt, erzeugt bei Gegenwart von Kalksalzen aus Fibrinogen ein unlösliches Produkt. Die Wirkung der zymoplastischen Substanzen nach Schmidt beruht nach ihm auf sauren Phosphaten. Als einer der ersten bestritt Wooldridge[6]), daß ein Ferment bei der Koagulation im Spiele sei. Nach ihm ist das Thrombin nur ein Produkt der Gerinnung. Auf seine sonst wenig geteilten Anschauungen griff neuerdings Nolf[7]) zurück

---

[1]) Fuld, Centralbl. f. Physiol. 1902. — Fuld und Spiro, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 5; Fuld und Spiro, Der Einfluß einiger gerinnungshemmender Agenzien usw. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 5, 171.

[2]) P. Morawitz, Beiträge zur Kenntnis d. Blutgerinnung 1. Arch. f. klin. Med. 79, 1 f.; Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 5, 133; Ergebnisse d. Physiol. IV. Jahrg., 1. u. 2. Abt., 1905.

[3]) Vgl. auch Fuld, Über d. Zeitgesetz d. Fibrinfermentes. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, 514 f.

[4]) Freund, Über d. Ausscheidung v. phosphorsaurem Kalk als Ursache d. Blutgerinnung. Wiener med. Jahrb. 1889, 554 bis 568.

[5]) Lilienfeld, Über Blutgerinnung. Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 89 f.

[6]) Wooldridge, Die Gerinnung d. Blutes. Deutsch von M. v. Frey, Leipzig 1891.

[7]) P. Nolf, Eine neue Theorie d. Blutgerinnung. Ergebn. f. innere Med. u. Kinderheilkunde 10, 275 bis 341, 1913. — Contribution à l'étude de la coagulation du sang, 3e mémoire. Arch. internat. de Physiol. 6, H. 1, 1908.

und versuchte, das Problem vom kolloidchemischen Standpunkt aus zu lösen. Nach ihm treten bei der Gerinnung wenigstens drei Kolloide zueinander in Beziehung, und zwar in zwei Phasen. In der ersten kommt es bei Gegenwart von Ca-Ionen zu einer Verbindung von Thrombogen und Thrombozym (letzteres entspricht etwa der Morawitzschen Thrombokinase); in der zweiten wird dann das Fibrin ausgefällt. Auch nach Nolf ist das Thrombin nicht Veranlassung, sondern Produkt der Gerinnung. Wie Wooldridge, ist auch er der Meinung, daß alle zur Blutkoagulation erforderlichen Stoffe bereits im strömenden Blute vorhanden sind. Daß es hier nicht zur Gerinnung kommt, liegt daran, daß die in Betracht kommenden Kolloide nur träge aufeinander reagieren, und andererseits von der Leber gebildete Antikörper hemmend wirken. Eine Beschleunigung und damit Auslösung des Prozesses tritt erst unter der Einwirkung thromboplastischer Substanzen ein. Diese sind nicht unbedingt erforderlich, beschleunigen aber den Ablauf der Reaktion sehr. Die Natur der thromboplastisch wirksamen Stoffe ist durchaus nicht einheitlich. In den Geweben sind sie reichlich vorhanden. Außer diesen kann man aus den Geweben auch noch Thrombozym extrahieren. So tritt stets Thrombozym aus den Zellen des Blutes und der Gefäßwand ins Blut. Allerdings ist es nur in solchen Geweben vorhanden, die mit Blutgefäßen versorgt sind (z. B. nicht im Sperma).

Nolf faßt den ganzen Gerinnungsvorgang also auf als Unterbrechung eines Gleichgewichtszustandes in einer kolloidalen Lösung mit Vereinigung und Unlöslichwerden der bis dahin gelösten Kolloide. Thromboplastisch wirkt dabei jeder Stoff oder Einfluß irgendwelcher Art, der den Gleichgewichtszustand in dem Sinne stört, daß es zu den Reaktionen Thrombozym + Thrombogen = Thrombin, und Thrombozym + Thrombogen + Fibrinogen = Fibrin kommt. Außer Gewebsextrakten, von denen die alkoholischen viel weniger intensiv wirken als die wäßrigen, entfaltet beispielsweise thromboplastischen Einfluß Adhäsion an einer Glas- oder Metallwand, fein pulverisierte Stoffe, wie Glas- oder Kohlepulver, Verdünnung eines Oxalatplasmas u. a. m. Während die Morawitzsche Kinase eine fermentartige Funktion erfüllt, faßt Nolf die thromboplastischen Wirkungen rein physikalisch-chemisch auf. Die Rolle, welche die Gewebsextrakte spielen, sieht er von dem Standpunkte aus an, daß Kolloidlösungen durch andere, in einem bestimmten Verhältnis zugesetzte Kolloide ausgefällt werden. Die Wirkung des zugesetzten Kolloids hängt dabei ganz ab „von der chemischen Natur und dem physikalischen Zustand der thromboplastischen Substanz, nämlich von der Ausdehnung der Kontaktflächen mit der Lösung und von ihrer elektrischen Polarität“.

Dieser kolloidchemischen Betrachtungsweise neigen neuerdings viele Forscher zu. So vor allem Hekma[1]), Howell, Rettger, Stromberg[2])

[1]) E. Hekma, Über das Fibrin und seine Beziehungen zu einigen Problemen der Biologie u. Kolloidchemie. Mit bes. Berücks. des Blutgerinnungsproblems. Diese Zeitschr. **62**, 161, 1914; **63**, 184 bis 203, 204 bis 220; **64**, 86, 1914; **65**, 311, 1914.

[2]) H. Stromberg, Methodisches über Blutgerinnung nebst Be-

und andere. Im Einklang mit den weiten Grenzen, die Nolf dem Begriff der thromboplastischen Wirkung und Substanzen steckt, zeigte de Waele[1]), daß die verschiedensten Stoffe (kolloidale Metalle, Salzsäure, Alkohol, Olivenöl, Jodkali und andere), Tieren intravenös beigebracht, thromboplastisch wirken. Dabei folgt auf eine positive (gerinnungsbeschleunigte) Phase eine negative. Howell[2]) und Rettger[3]) gehen so weit wie Nolf, daß sie den von den Zellen und Geweben gelieferten zymoplastischen Substanzen eine spezifische Bedeutung für die Entstehung des Thrombins absprechen. Deren Wirksamkeit sei durchaus derjenigen solcher Stoffe gleichzusetzen, die durch große Oberfläche, also physikalisch-chemisch wirkten (Kohle-, Glaspulver). Nicht im Einklang hiermit steht die Feststellung Loebs[4]), daß die aus den Geweben zu gewinnenden, gerinnungsfördernden Stoffe, die er Koaguline nennt, in der Wirbeltierreihe spezifisch wirken. Zu dem gleichen Ergebnis kam Muraschew[5]). Auch die Versuche Rumpfs[6]) sprechen für eine spezifische Wirkung, wenigstens der Thrombokinase.

2. Die Anschauung von der Lipoidnatur der thromboplastischen Substanzen.

Aus dem bisher Dargelegten geht hervor, daß die Meinungen über Wesen und Wirkung der gerinnungsbeschleunigenden Gewebsbestandteile sehr weit auseinandergehen. Einerseits ist bis heute nicht geklärt, ob es sich um Fermente, eventuell deren Vorstufen, in den Geweben handelt oder nicht, und

---

merkungen über d. Wesen d. Gerinnungsvorganges. Diese Zeitschr. 37, H. 171, 1911.

[1]) H. de Waele, L'action thromboplastique est générale et commune usw. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Ther. Orig. 17, S. 314 bis 332.

[2]) Howell, The coagulation of blood. The Cleveland medic. Journ. Januar u. Februar 1910; Ders., The preparation and properties of thrombin, together with observations on antithrombin and prothrombin. Amer. Journ. of physiol. 26, 453 bis 473, 1910.

[3]) L. J. Rettger, The coagulation of blood. Amer. Journ. of physiol. 24, 406 bis 435, 1909.

[4]) L. Loeb, Über die Anwesenheit spezifischer Koaguline in den Geweben usw. The medic. News, New York, August 1903.

[5]) Muraschew, Über d. Spezifizität d. Fibrinfermentes usw. Arch. f. klin. Med. 80, 187f.

[6]) Fr. Rumpf, Über d. Einfluß d. Lipoide auf d. Gerinnung d. Blutes. Diese Zeitschr. 55, H. 1/2, 101 bis 115, 1913.

andererseits ist dementsprechend die chemische Struktur des aktiven Prinzips noch unbekannt.

In neuerer Zeit mehren sich nun die Untersuchungen, die nachzuweisen suchen, daß die thromboplastischen Gewebskomponenten Lipoidnatur besitzen.

Es wurde schon erwähnt (s. oben S. 2), daß Schmidt[1]) durch Alkoholextraktion hitzebeständige Gerinnungsauslöser aus den Geweben gewinnen konnte. Er ging dabei so vor, daß er Leber mehrmals mit siedendem Alkohol behandelte, das erhaltene Extrakt in Wasser emulgierte und die Emulsion zu Pferdeplasma zusetzte. Auch andere Organe (Lymphdrüsen, Pferdeblutkörperchen, Gehirn, Pankreas, Froschmuskeln) lieferten gleich wirksame Auszüge. Aus Blutplasma und -serum waren sie gleichfalls darstellbar, allerdings in geringerer Menge. Schmidt konstatierte, daß diese Extrakte reichlich Lecithin enthalten[2]). Zwei Schüler Schmidts, von Samson-Himmelstjerna[3]) und Nauk[4]), fanden in ihren Experimenten eine gerinnungsbeschleunigende Wirkung von Lecithin. Dies wurde von Wooldridge bestätigt. Nach seiner Theorie tritt bei dem Koagulationsvorgange ein A-Fibrinogen und ein B-Fibrinogen zusammen; dabei überträgt das A Lecithin auf das B[5]). Ferner fand er, daß Lecithin Peptonblut zur Gerinnung bringe[6]). Spiro und Ellinger[7]) gelang es, Pepton- und Hirudinplasma durch ein hitzebeständiges Alkoholextrakt aus Leukocyten schnell zu koagulieren. Howell[8]) konnte aus getrocknetem Hirn oder Thymus ein ätherisches Extrakt gewinnen und darin ein dem Kephalin nahestehendes Phosphatid feststellen. Dieses entwickelte deutlich thromboplastisches Vermögen. Ovolecithin (aus Eidotter hergestelltes Lecithin) zeigte diese Fähigkeit nicht. Die thromboplastische Wirkung seines Phosphatids erklärt sich Howell dadurch, daß es das im Peptonplasma vorhandene Antithrombin neutralisiere. Auf dem Physiologenkongreß in Wien 1910 betonte dann Freund die gerinnungsfördernden Eigenschaften des Lecithins wieder

---

[1]) A. Schmidt, Zur Blutlehre. Leipzig 1892, S. 99.

[2]) l. c. S. 106.

[3]) von Samson-Himmelstjerna, Experimentelle Studien über das Blut. Inaug.-Diss. Dorpat 1882.

[4]) Nauk, Über eine neue Eigenschaft d. Produkte der regressiven Metamorphose. Inaug.-Diss. Dorpat 1886.

[5]) Wooldridge, Zur Gerinnung des Blutes. Arch. f. Anat. u. Physiol. Physiol. Abt. 1883, S. 389 bis 393; Ders., Beobachtungen über die Koagulation des Blutes. Journ. of Physiol. 4, 367 bis 369, 1884.

[6]) Wooldridge, Chem. of the blood 1893.

[7]) Spiro und Ellinger, Zeitschr. f. physiol. Chem. 23, 121, 1897.

[8]) W. H. Howell, The nature and action of the thromboplastic (zymoplastic) substance of the tissues. Amer. Journ. of physiol 31, 1 bis 21, 1912.

besonders, die bei Gegenwart von Kalksalzen zur Geltung kämen. Ebenso verhalte sich das Kalksalz der Dioleinglycerinphosphorsäure, eines Lecithinbestandteiles. Ein styptisch wirkendes Präparat für die chirurgische Praxis stellten dann Kocher und Fonio[1]) her aus Blutplättchen. Dieses Koagulin Kocher-Fonio ist alkohol- und kochsalzlöslich.

Nach alledem stand so ziemlich fest, daß es thromboplastisch wirkende Lipoide gibt. Zak unternahm es neuerdings nun nachzuweisen, daß die Thrombokinase von Morawitz Lipoidnatur besitzt[2]). Er stellte sich aus Rinderhirn Phosphatide her, und zwar nach der Methode von Erlandsen[3]). Das zerkleinerte und getrocknete Hirn wurde mit Petroläther extrahiert, dieses petrolätherische Extrakt mit Aceton gefällt, der Niederschlag wieder in Petroläther gelöst und die Fällung mit Aceton noch zweimal wiederholt. Durch CO_2 wurde die letzte petrolätherische Lösung getrocknet und dies im Vakuum vervollständigt. Die so gewonnenen rötlich-gelben Massen ließen sich gut emulgieren und wurden dann verwendet. Bei Zusatz solcher Emulsion zu Pferdecitratplasma, das durch 5%ige $CaCl_2$-Lösung zur Gerinnung gebracht wurde, fand er gegenüber der Kontrolle eine erhebliche Beschleunigung. Citrat- oder Oxalatplasma, dessen Lipoidgehalt durch 18- bis 30stündiges Schütteln mit Petroläther herabgesetzt war, konnte durch $CaCl_2$ nur langsam oder gar nicht koaguliert werden. Zusatz der Phosphatidemulsion aber rief wieder schnelle Gerinnung hervor. Zak schließt hieraus, daß die Plasmalipoide für den Gerinnungsprozeß gerade so wichtig und unentbehrlich seien wie Kalksalze, und daß die Plasmalipoide die Rolle einer Kinase spielen. Um diese These weiter zu stützen, nahm er noch qualitative Änderungen der Plasmalipoide vor. Steapsin (Grübler) hob die Gerinnung auf, ebenso Pankreatin (Rhenania); auch Tabakdiastase wirkte ähnlich. Saponin, das mit Lipoiden reagiert (nach Porges und Neubauer[4]) werden durch Saponin Cholesterinaufschwemmungen gefällt, Lecithinaufschwemmungen geklärt), hemmte die Gerinnung, und zwar mit steigender Menge des Zusatzes. Ferner konnte Zak beobachten, daß Alkaloide, die lecithinfällend wirken, auch Gerinnung hemmen. Auch Aceton, das Phosphatide fällt, wirkte gerinnungshemmend. — Weitere Beobachtungen ergaben[5]), daß im Oxalatplasma, das längere Zeit im Eisschrank stand und die von Hammarsten[6]) mitgeteilte Sedimentierung gerinnungswichtiger Substanzen zeigte, durch Phosphatidemulsion die Gerinnungsverzögerung rückgängig gemacht werden konnte. Auch die durch

[1]) Fonio, Korrespondenzblatt f. Schweizer Ärzte 1913, Nr. 13.

[2]) E. Zak, Studien zur Blutgerinnungslehre. I. Mitteilg. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 70, 27ff., 1912.

[3]) Siehe hierüber Bang, Biochemie der Zellipoide. Ergebn. d. Physiol. 6.

[4]) Porges und Neubauer, diese Zeitschr. 7, 152f., 1908.

[5]) E. Zak, Studien zur Blutgerinnungslehre. II. Mitteilg. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 74, 1ff., 1913.

[6]) Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 333f., 1896.

Filtration durch Berkefeldfilter erzeugte Ungerinnbarkeit des Plasmas[1]) kann auf diese Weise wieder behoben werden. Das wirksame Moment für die Beeinträchtigung des Koagulationsvermögens soll in beiden Fällen in der Entfernung der Blutplättchen zu suchen sein. Zak schließt daher auf „eine teilweise funktionelle Identität der Blutplättchen und der in die Gruppe der Lecithine gehörenden Hirnphosphatide". Ferner fand er, daß lipoidarm gemachte Erythrocytenstromata eine schnellere Gerinnung hervorrufen als lipoidhaltige, und schloß daraus, daß in den Stromata hemmende Lipoide vorhanden seien. Die extrahierten Erythrocytenlipoide verlangsamten auch in der Tat. Man findet unter ihnen das Cholesterin reichlich vertreten. Da auch sonst biologisch ein Antagonismus zwischen Cholesterin und Lecithin besteht, ging Zak an die Prüfung der reinen Cholesterinwirkung. Nach Überwindung sich ent gegenstellender technischer Schwierigkeiten gelang es, durch Verreiben von Cholesterin mit Oxalatplasma, nachfolgenden 2 stündigen Aufenthalt der Mischung bei 0° und ebenso lange im Brutschrank ein Cholesterinplasma zu erhalten, das durch $CaCl_2$ nur verzögert gerann. Da jedoch diese Versuche nicht gleichmäßig ausfielen, erscheint die hemmende Wirkung des Cholesterins Zak selbst noch nicht genügend sichergestellt. Ein Vergleich zwischen dem Einfluß von Rinderhirnphosphatid- und lipoidarmen Erythrocytenstromatazusatz ergab eine 10 mal stärkere Beschleunigung durch erstere. „Die gerinnungsauslösende Wirkung der Lecithine ist also eine spezifische"[2]). Auf Grund all dieser Versuche ist Zak von der lipoiden Natur der Morawitzschen Thrombokinase überzeugt. — Im Reagensglase hatten lipolytisch wirkende Fermente eine hemmende Wirkung gezeigt. Bei intravenöser Injektion von Steapsin (Grübler) und Pankreatin (Rhenania)[3]) trat dasselbe Ergebnis auf. Inaktivierte Zak das Ferment jedoch vor der Einspritzung, so erzielte er durch diese eine Gerinnungsbeschleunigung. Hieraus folgert er eine spezifische Bedeutung der Lipase für die Blutgerinnung. Er glaubt, daß die Blutlipase den stets zuströmenden, gerinnungsauslösenden, lecithinartigen Stoffen entgegenwirke und so das Blut intravasculär flüssig erhalte.

Zu den gleichen Ansichten über Thrombokinase wie Zak kamen auf Grund ihrer Versuche J. Bordet und L. Delange. Schon früher wiesen diese beiden Autoren nach, daß von den Blutzellen für die Bildung des Thrombins die Blutplättchen eine besondere Bedeutung besitzen, und zwar wegen ihres Gehaltes an Thrombokinase oder Cytozym, wie sie es nennen. Das Cytozym der Blutplättchen und das der Gewebe sind miteinander identisch. Abweichend von Morawitz fanden sie es thermo-

---

[1]) W. Cramer und Harold Pringle, Quarterly Journ. of experim Physiol. 6, Nr. 1, 5, II, 1913.

[2]) Siehe Anmerk. 5 Seite 7.

[3]) E. Zak, Über Beeinflussung der Blutgerinnung durch spezifisch wirkende Substanzen. Verhandl. d. Ges. deutscher Naturf. u. Ärzte, 85. Vers., Wien, Sept. 1913. Tl. 2, H. 2, S. 297 bis 298, 1914.

stabil[1]). Kurz vor Erscheinen der ersten Mitteilung von Zak[2]) berichteten die beiden Forscher, daß das aus Blutplättchen, Muskelsaft und Pepton gewinnbare Cytozym in Alkohol, Chloroform, Toluol löslich, in Aceton jedoch so gut wie unlöslich sei[3]). Das Fibrinferment entsteht nach ihnen durch Zusammentritt dieses thermostabilen Cytozyms und des thermolabilen (bei 56° inaktivierbaren) Serozyms (= Thrombogen) bei Anwesenheit von Ca-Salzen[4]). Das Cytozym erklärten sie vorläufig noch nicht mit aller Bestimmtheit für eine Lipoidsubstanz, glaubten aber insofern die Frage nach seiner chemischen Charakterisierung vorangebracht zu haben, daß eine große Reihe von Substanzen, besonders albuminoide Stoffe, hierfür nicht mehr in Betracht kämen. Ihr nächstes Ziel war nun möglichste Reindarstellung des Cytozyms[5]). Zu diesem Zwecke extrahierten sie gut gewaschene Blutplättchen mit 25 Teilen absoluten Alkohols, verdampften diesen und nahmen den Rückstand mit derselben Menge Alkohols wieder auf, zentrifugierten und filtrierten. Der Rückstand ließ sich aber auch ebensogut in aqua destillata emulsionieren. Diese Extrakte entwickelten starke cytozymatische Wirkung. Minimalste Mengen getrockneten und dann emulgierten Extraktes ($^1/_{20000}$ mg!) wirkten schon gerinnungsauslösend. Der Rückstand war außer in Alkohol auch in Toluol, Petroläther, Chloroform löslich, fast gar nicht dagegen in Aceton. Dasselbe Extrakt erhielten sie aus Muskelsaft. Zur Reindarstellung dampften sie alkoholisches Muskelextrakt bei 40° bis auf $^1/_4$ seines Volumens ein, wobei sich ein Gemisch alkoholunlöslicher Stoffe niederschlug, die jedoch wasserlöslich und für die Gerinnung inaktiv sind, also kein Cytozym. Wahrscheinlich handelt es sich um Stoffe der regressiven Metamorphose des Muskels (z. B. Kreatin) und Salze. Aus getrockneten Muskeln konnten sie durch Toluol kein Cytozym gewinnen; dies gelang nur dann, wenn das Cytozym erst mit Alkohol in Berührung gekommen und dadurch für das Toluol löslich gemacht worden war. Diese Beobachtung wurde nun dazu benutzt, die im Muskel enthaltenen Fettsubstanzen aus den Extrakten zu eliminieren, indem die getrockneten Mus-

---

[1]) J. Bordet u. L. Delange, L'intervention des plaquettes sanguines dans la coagulation du sang. Bull. de l'Académie roy. de Méd. de Belgique 1911. — La coagulation du sang et la genèse de la thrombine. Ann. de l'Inst. Pasteur 1912.

[2]) J. Bordet u. L. Delange, Betrachtungen über die Rolle der Lipoide bei der Blutgerinnung. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 71, 293 f. 1913.

[3]) J. Bordet u. L. Delange, Sur la nature du principe coagulant du suc de muscles, de la pepton, et des plaquettes. Ann. et bull. de la soc. roy. d. scienc. méd. et natur. de Bruxelles 70, 404 bis 408, 1912.

[4]) J. Bordet u. L. Delange, La coagulation du sang et la genèse de la thrombine. Ann. de l'Inst. Pasteur 26, 657 bis 674 u. 737 bis 766, 1912.

[5]) J. Bordet u. L. Delange, Sur la nature du cytozyme, Recherches sur la coagulation du sang. Ann. de l'Inst. Pasteur, Jahrg. 27, Nr. 5, 341 bis 357, 1913.

keln zunächst mit Toluol ohne Cytozymverlust entfettet wurden. Aus so vorbehandelten Muskeln wurde dann ein Alkoholextrakt gemacht und dieses nach Verdampfen des Alkohols in Toluol gelöst. Dabei blieben dann weitere inaktive Verunreinigungen des Extraktes ungelöst zurück. Durch Aceton ist ein solches reines, in Toluol gelöstes Cytozym fast ganz ausfällbar. Der Vergleich ihrer Methode mit den für die Lipoiddarstellung üblichen machte die Verfasser darauf aufmerksam, daß die cytozymhaltigen Extrakte diejenigen sind, die das Muskel- oder Zellecithin enthalten. Sie legten sich daher die wichtige Frage vor: ist das Cytozym nur eine Begleitsubstanz des Lecithins oder selbst Lecithin? Die darauf gerichteten Untersuchungen machten es im höchsten Grade wahrscheinlich, daß das Cytozym lecithinartig gebaut ist. Dafür spricht auch der Umstand, daß das im Handel erhältliche Lecithin-Agfa Cytozym ersetzen kann bei der Gerinnung. Trotzdem möchten die Verfasser auch jetzt noch nicht mit Bestimmtheit die Identität von Cytozym und Lecithin behaupten, halten sie jedoch für überaus wahrscheinlich. Ihr Ziel, ein möglichst aktives und möglichst wenig verunreinigtes Cytozym, glauben sie erreicht zu haben. Sie prüften nun weiterhin das intravenöse Verhalten dieses Stoffes und fanden, daß eine Emulsion in physiologischer Kochsalzlösung davon nicht toxisch wirkt[1]). Die Gerinnbarkeit des Blutes wird durch solche Injektionen bedeutend gesteigert. Fängt man das Blut eines so behandelten Tieres in einem paraffinierten Gefäße auf, so gerinnt es! Ein Beweis, daß das Wirksame beim Paraffinieren die Verhinderung der Thrombokinaseabgabe sei. Die gerinnungsförderliche Wirkung der Einspritzungen war allerdings nur von sehr kurzer Dauer (höchstens $^1/_2$ Stunde). Es folgt darauf keine negative Phase (d. h. Verlangsamung).

Die hier kurz wiedergegebenen Anschauungen von Zak, Bordet und Delange werden von Rumpf und Pekelharing bekämpft. Rumpf, ein Schüler von Morawitz, stellte vergleichende Untersuchungen an über die Wirkung der Thrombokinase und der nach Zak gewonnenen Rinderhirnphosphatide[2]). Er fand bei Gebrauch der Phosphatide in der Tat eine geringe Beschleunigung, doch wirkte die durch Kochsalzextraktion aus Leber gewonnene Thrombokinase ganz unvergleichlich stärker. Rumpf lehnt daher die Behauptung von der Identität dieser beiden Substanzen ab. Mit Petroläther ausgeschütteltes Plasma wurde leicht trüb befunden. „Da nur Lipoidzusatz, nicht aber Thrombokinase und $CaCl_2$ das Plasma zur Gerinnung bringen können, so erscheint die Ansicht wohl begründet, daß die Lipoidarmut des Plasmas ungünstige Bedingungen für den Ablauf der Gerinnung abgibt.“[3]) Solches lipoidarmes Plasma gerinnt auch auf Zusatz von frischem Blutserum nicht,

[1]) J. Bordet u. L. Delange, Injections intraveineuses de cytozyme et coagulabilité du sang. Compt. rend. hebdom. d. séance de la soc. de biol. 75, Nr. 28, S. 168 bis 170, 1913.

[2]) Friedr. Rumpf, Über den Einfluß der Lipoide auf die Gerinnung des Blutes. Diese Zeitschr. 55, H. 1/2, 101 bis 115, 1913.

[3]) l. c. S. 108.

obwohl darin doch neben fertigem Thrombin auch Lipoide enthalten sind! Rumpf schließt, „daß die Bedingungen im lipoidarmen Plasma offenbar doch sehr komplizierter Natur sind“[1]) und weist „auf die Möglichkeit von Änderungen physikalischer Faktoren hin, an die bei einem so komplizierten Gemenge, wie es das Plasma ist, entschieden gedacht werden müsse“. In einem Serum-Fibrinogengemisch konnte Rumpf durch Phosphatidzusatz nur eine Gerinnungsbeschleunigung von 30°|₀, durch Thrombokinase von 600°/₀ erzielen. Er erkennt demgemäß an, daß die Lipoidsubstanzen aus Rinderhirn förderlich wirken, glaubt jedoch, sie auf eine Stufe mit den durch fein verteilte Fremdkörper hervorgerufenen thromboplastischen Wirkungen stellen zu sollen. Bei Peptonblut konnte nur durch Thrombokinase, nicht durch Phosphatide oder Kohleaufschwemmung Gerinnung ausgelöst werden. Er schließt daraus, daß nicht nur quantitative, sondern auch qualitative Unterschiede zwischen Tkrombokinase und Lipoiden bestehen. Auch bei Hirudinblut erzielte er ähnliche Ergebnisse.

Pekelharing[2]) verneint ebenfalls auf Grund seiner Experimente die Bedeutung der Lipoide für die Blutgerinnung im Sinne von Zak, Bordet und Delange. Wie Rumpf äußert auch er Bedenken, daß einfach die Entfernung der Lipoide aus dem Plasma das wirksame Moment bei der Petrolätherausschüttelung sei. Es gelang ihm nämlich, die Ungerinnbarkeit des so behandelten Oxalatplasmas durch nachfolgende Durchleitung von Luft und CO_2 wieder aufzuheben, ohne dazu eines Lipoidzusatzes zu bedürfen. Nach ihm wirkt der Petroläther dadurch, daß er infolge der Schüttelbehandlung in feinster Emulsion ins Plasma übertritt. Daher auch die leichte Trübung nach dieser Prozedur. Das Durchleiten von Luft und CO_2 entfernt ihn wieder und hebt damit die Ungerinnbarkeit auf. Daß Phosphatide beschleunigen, gibt auch er zu. Hypothesen über die Art ihrer Wirkung seien jedoch bei dem heutigen Stande unseres Wissens verfrüht. Pekelharing hält an seiner schon oben (S. 2) mitgeteilten Theorie fest, nach der die geformten Elemente des Blutes an dieses bei der Gerinnung Nucleoproteide abgeben, die mit Ca-Salzen Fibrinferment liefern. Durch seine Versuche kommt er zu der Überzeugung, daß die beschleunigende Wirkung des Lecithinzusatzes auf der Neutralisation im Oxalatplasma vorhandener gerinnungshemmender Stoffe beruht, nicht auf thrombokinetischer Wirkung[3]). Bordet und Delange gegenüber bezweifelt er, daß das Thrombin durch Zusammentritt von Serozym und lipoidartigem Cytozym entsteht, da ja lipoidarm gemachtes Plasma durch Luft- und CO_2-Durchleitung wieder gerinnbar wird. Gelegentlich konnte sogar eine leicht hemmende Wirkung von Lecithin beobachtet werden. Er kommt zu dem Schluß: „Die Phospha-

---

[1]) l. c. S. 108.

[2]) C. A. Pekelharing, Über den Einfluß von Phosphatiden auf die Blutgerinnung. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 89, H. 1/2, 22 bis 38, 1914.

[3]) Vgl. hiermit die Ansicht Howells (s. o. S. 6).

tide wirken nur insoweit, als sie imstande sind, Hindernisse gegen die Bildung des Thrombins aus Nucleoproteiden und Kalksalzen und gegen die Bildung oder die Ausscheidung des Fibrins fortzuräumen. Sie sind also nicht als ‚Kinasen' im geläufigen Sinne des Wortes zu betrachten"[1]). Die Morawitzsche Thrombokinase besteht ebenso wie sein Thrombogen aus Nucleoproteiden[2]).

Gegenüber diesen Feststellungen von Rumpf und Pekelharing halten Bordet und Delange daran fest, daß durch eine Vereinigung von Serozym und lipoidartigem Cytozym Thrombin entsteht[3]). Sie präzisieren ihre Anschauungen über Thrombokinase und Lipoide aber noch genauer und geben zu, daß Gewebssäfte für die Gerinnung des Säugetierblutes sehr förderlich wirken; jedoch seien sie keineswegs unbedingt erforderlich. Die Blutplättchenwirkung beruht auf ihrem Cytozymgehalt. Die Gewebe enthalten diese lipoidartige Substanz auch, jedoch außerdem noch andere Gerinnungsbeschleuniger. Letztere sind kochsalzlöslich und, wie sie Rumpf und Pekelharing zugeben, weit wirksamer als ihr Cytozym oder Blutplättchen. Sie lieferten dafür auch den experimentellen Nachweis: $^{1}/_{2}$ Stunde auf 57° erhitzter Gewebssaft wird zwar nicht inaktiv, verliert aber erheblich an cymoplastischer Kraft. Gewebssaft enthält also außer lipoidem Cytozym noch eine sehr viel labilere Substanz, die äußerst wirksam und nicht thermostabil ist. Solcher Gewebssaft wirkt ferner toxisch bei intravenöser Applikation (Gerinnselbildung!), was vom Cytozym nicht gilt[4]). Trotzdem bleibt für die beiden Autoren bestehen, daß bei der „autonomen" Blutgerinnung die Blutplättchen und -zellen ihre beschleunigende Eigenschaft lediglich dem lipoidartigen Cytozym verdanken. Über die chemische Konstitution dieser Substanz legen sie sich auch jetzt noch nicht endgültig fest. Identität mit Lecithin halten sie für möglich, ja sogar wahrscheinlich, aber nicht für absolut sicher. Vielleicht sei nur die Dioleinglycerinphosphor-Gruppe des Lecithins nach Freund das Wirksame (s. o. S. 7). Glycerin jedenfalls wirke cytozymartig.

Die Frage nach der Rolle und chemischen Struktur des Cytozyms versuchten außer den bisher genannten Forschern dann auch Fränkel

---

[1]) Pekelharing, l. c. S. 36.

[2]) Dieser Auffassung von der Nucleoproteidnatur der Thrombokinase neigt übrigens auch Morawitz selbst zu. Siehe darüber: P. Morawitz Die Chemie der Blutgerinnung, Ergebnisse der Physiol. 1905, IV. Jahrg. 1. u. 2. Abt., S. 372.

[3]) J. Bordet u. L. Delange, La question du rôle des lipoides dans la coagulation du sang. Berl. klin. Wochenschr. 51. Jahrg., 1914, Nr. 11, S. 497ff.

[4]) J. Bordet u. L. Delange, Injections intraveineuses de cytozyme et coagulabilité du sang. Compt. rend. hebdom. d. séanc. de la soc. de biol. 75, Nr. 28, 168 bis 170, 1913.

und Thiele[1]) zu klären. Angeregt wurden sie dazu durch den Gedankengang und die Ergebnisse von Hirschfeld und Klinger[2]). Letztere beiden Autoren befassen sich schon länger mit der Frage, ob für die Gerinnungserscheinungen nicht ähnliche Gesetze gelten, wie für die immunisatorischen Vorgänge. Sie fanden, daß die in alkoholischen Gewebsauszügen enthaltene cytozymatische Substanz, die coktostabil, mit der Thrombokinase identisch und mit den Globulinen aus Serum ausfällbar ist, in elektiver Weise durch luetisches Serum unwirksam gemacht werde; normales Serum übt diesen Einfluß nicht aus. Darauf gründen sie eine neue Reaktion zum Nachweis von Lues. Fränkel und Thiele bestätigten die Resultate der beiden Verfasser und gingen von diesem Ausgangspunkt dann an die nähere Untersuchung des zu ihren Versuchen benutzten Cytozyms (enthalten in alkoholischem Extrakt aus Meerschweinchen- oder Rinderherz). Sie fanden, daß die thromboplastische Wirkung der ätherlöslichen Fraktion des alkoholischen Herzextraktes zukommt. In dieser sind Phosphatide und daneben eine jekorinartige Substanz. Durch Aceton konnten sie die ätherlösliche Fraktion in eine acetonlösliche (mit der jekorinartigen Substanz) und eine acetonunlösliche enthaltend die Phosphatide) zerlegen. Die so gefällten Phosphatide besaßen, zumal nach Reinigung durch mehrmalige Alkoholfällung, gar keine Cytozymwirkung![3]) Dagegen kam der jekorinartigen Substanz (die nur schwer von den Phosphatiden zu trennen war) die volle Wirkung zu. Sie schließen: „es ergibt sich also aus unseren Versuchen, daß die Cytozymwirkung (Thrombokinase) im wesentlichen der ätherlöslichen Fraktion resp. der darin enthaltenen jekorinähnlichen Substanz zukommt"[4]).

Zu einer noch mehr den Anschauungen von Zak, Bordet und Delange fernstehenden Ansicht über die Thrombokinase kamen Stuber und Heim[5]). Stuber hat schon früher einen gerinnungsbeschleunigenden Einfluß von Cholesterinestern festgestellt. Da die Zakschen Versuche die Unwirksamkeit des Cholesterins für die Gerinnung ergeben hätten, schlossen die beiden Autoren, daß das Säureradikal der Ester das beschleunigende Moment darstelle. Experimentelle Prüfung ergab starke Gerinnungsbeschleunigung durch Ölsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure

---

[1]) E. Fränkel u. F. Thiele, Über die Gerinnungshemmung durch Luessera (Hirschfeld u. Klinger) und die chemische Natur des Cytozyms (vorläuf. Mittlg.). Münch. med. Wochenschr. H. 42, Okt. 1914, S. 2095.

[2]) Hirschfeld u. Klinger, Zeitschr. f. Immunitätsforschung 20, Nov. 1913, I. Mittlg. S. 51 ff., II. Mittlg. S. 81 ff. Dies., Über die Gerinnungsreaktion bei Lues. XXXI. Deutsch. Kongreß f. innere Med., Wiesbaden April 1914. Referat: Münch. med. Wochenschr. **1914**, Nr. 21, S. 1193.

[3]) Vgl. die abweichenden Resultate von Zak, Bordet und Delange.

[4]) l. c. S. 2096.

[5]) B. Stuber u. R. Heim, Über Fettsäuren und Blutgerinnung, zugleich eine chemische Erklärung des Gerinnungsvorganges. Münch. med. Wochenschr. **1914**, H. 30, 1661 f.

sowohl als auch durch deren Triglyceride. Tristearin beispielsweise beschleunigte die Koagulation von Pferdeoxalatplasma ebenso stark wie aus Pferdeleber nach Morawitz gewonnene Thrombokinase. Die Wirkung dieser letzteren sei auf ihren Gehalt an Fettsäuren bzw. Triglyceriden zu beziehen. Noch erheblicher als selbst die Thrombokinase förderte aber der Zusatz von Steapsin (Grübler) die Gerinnung. Da Zak das entgegengesetzte Resultat mit diesem Ferment erhielt, weisen sie darauf hin, daß die zugesetzten Mengenverhältnisse von entscheidender Bedeutung seien. Vermehrter Zusatz hebt die beschleunigende Wirkung auf. Das Ferment verwandten sie in Glycerinlösung! Jedoch sei dies für das Ergebnis irrelevant[1]). Auch enthält das gelöste Steapsin nicht etwa ätherlösliche Beimengungen. Seine Wirkung beruht auf seinem lipolytischen Vermögen. Die Wirkung des Tristearins ist begründet in der lipolytischen Funktion der Blutlipase, die aus ihm Stearinsäure abspaltet. „Es besteht eine direkte Proportionalität zwischen lipolytischem Vermögen und Gerinnungsbeschleunigung.“[2]) Prüfung der einzelnen Fettsäuren der homologen Reihe ergab, daß der gerinnungsfördernde Einfluß der Säuren mit der Zahl der im Molekül vorhandenen Kohlenstoffatome zunimmt. In späterer Veröffentlichung soll der Nachweis erbracht werden, „daß lipolytisches Ferment und Fettsäuren gleichbedeutend sind mit der Morawitzschen Thrombokinase resp. dem Thrombogen, so daß die 1. Phase des Gerinnungsprozesses einer Kalkfettseifenbildung, die 2. Phase dem Komplex Kalkfettseifefibrinogen entspräche, wobei als Katalysator das lipolytische Ferment zu denken wäre.“[3]) Letzteres ist die Blutlipase.

B. Eigene Versuche.

Die Betrachtung der Literatur über die Bedeutung lipoider Stoffe für die Blutgerinnung ergibt, daß von den verschiedensten, darunter sehr namhaften Forschern diesen Substanzen eine Rolle beim Koagulationsprozeß zugesprochen wird. Welcher Art diese ist, und wie der oder die wirksamen Stoffe chemisch zu charakterisieren sind, ist jedoch nach wie vor noch sehr dunkel.

Auf Anregung von Herrn Dr. Hueck widmete ich mich daher experimentellen Studien über die Beziehungen zwischen Lipoiden und dem Blutgerinnungsvorgang.

---

[1]) Bordet und Delange fanden eine cytozymatische Wirkung des Glycerins!

[2]) l. c. S. 1663.

[3]) l. c. S. 1664.

I. Methodik.

Der Einfluß irgendwelcher Substanzen auf die Gerinnung zeigt sich, außer in der Festigkeit des entstehenden Koagulums, besonders in der Geschwindigkeit des Reaktionsverlaufes. Jene unterliegt, da exakte Methoden nicht bestehen, der subjektiven Schätzung des Untersuchers, diese dagegen läßt sich auf verschiedene Weise praktisch hinreichend genau feststellen.

Es sind zur Bestimmung der Gerinnungszeit eine außerordentlich große Zahl von Methoden erdacht worden. Die wichtigsten und bewährtesten davon hat Morawitz im Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden beschrieben[1]).

Ein großer Teil dieser brauchbaren Methoden schreibt die Verwendung von Capillaren vor. Damit sind 1. die zum Versuch kommenden Blutmengen sehr klein und 2. infolge der ausgedehnten Adhäsion der dünnen Blutsäule die Gerinnungszeiten sehr kurz (z. B. die Methoden von Vierordt, Wright, Schultz).

Für meine Versuche kam es nun darauf an, eine größere Reihe von Gerinnungsproben, die miteinander verglichen werden sollten, gleichzeitig anstellen zu können. Ferner durften die Gerinnungszeiten nicht zu kurz ausfallen, da sonst die Beobachtung mehrerer Proben leiden mußte, und auch fördernde und hemmende Einflüsse nicht deutlich zum Ausdruck kamen, Schließlich mußte die Methode erlauben, daß zu den einzelnen Proben Zusätze solcher Stoffe, deren Einwirkung auf den Koagulationsvorgang studiert werden sollte, gemacht werden konnten.

Diesen Forderungen entsprachen auch andere, nicht capilläre Methoden nicht, wie die von Hinman und Sladen, Bürker. Brodie-Russel, Buckmaster, Kottmann.

Ich entschloß mich daher folgendermaßen vorzugehen:

Aus der Ohrrandvene des Kaninchens wurden je 10 Tropfen Blut in ein Reagensglas aufgefangen. Es galt nun zunächst festzustellen, ob die Proben gleichmäßig gerannen, und innerhalb welcher Zeit.

---

[1]) P. Morawitz, Die Blutgerinnung. Handbuch d. biochem. Arbeitsmethoden 5, 1, 1911, S. 231 ff.

Dies geschah in 11 Vorversuchen von je 10 Proben mit folgendem Ergebnis:

Nr.	Durchschnittliche Gerinnungsdauer der 10 Proben eines jeden Versuches Minuten	Kürzeste und längste Gerinnungsdauer der 10 Proben eines jeden Versuches Minuten
1	5	4— 6
2	6	5— 7
3	10	5—13
4	12	10—14
5	12	9—15
6	14	13—14
7	14	12—16
8	14	9—18
9	20	12—27
10	30	20—38
11	44	28—60

Die Gerinnung galt als eingetreten, wenn bei wagerechter Haltung des Reagensglases das Blut über die Grenzen des bei senkrechter Stellung eingenommenen Raumes nicht mehr hinübertrat. Die Prüfung hierauf darf nicht zu oft und nur sehr vorsichtig wiederholt werden, da sonst der Gerinnungsvorgang immer von neuem wieder gestört und so erheblich verlängert wird[1]).

Außer dieser hat die Methode noch eine Reihe von Fehlerquellen, die sie allerdings großenteils mit den oben erwähnten, anerkannten Verfahren teilt.

Je nach dem Tier, dessen Blut zur Verwendung kommt, ist die durchschnittliche Gerinnungsdauer bald kürzer, bald länger, wie die vorstehende Tabelle zeigt. Von nicht unerheblicher Bedeutung ist sodann die Temperatur, bei der die Koagulation erfolgt[2]). — Die 11 Versuche wurden bei Zimmertemperatur von 11 bis 18° C, die jedoch während jedes einzelnen Versuches innerhalb dieser Grenze annähernd einen konstanten Wert hatte, angestellt. — Um Ungleichmäßigkeiten vorzubeugen, müssen die Reagensgläser gleich weit und absolut sauber sein. Ein ganz besonders wichtiges Moment, das in erster Linie für

---

[1]) Vgl. P. Morawitz im Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden 5, 1, S. 247, 1911.

[2]) Bürker, Ein Apparat zur Ermittlung der Blutgerinnungszeit. Arch. f. d. ges. Physiol. 118, 452f., 1907.

die Größe der Schwankungen um die Durchschnittswerte in Betracht kommt, liegt darin, daß das Blut meist sehr ungleich schnell aus der angeschnittenen Vene tropft, und so die einzelnen Proben von je 10 Tropfen einen wechselnden Gehalt von Gewebssaft beigemischt erhalten[1]). So konnte deutlich beobachtet werden, daß die großen Gerinnungszeiten bei schnellem, die kleinen bei langsamem Ausfließen der Blutstropfen auftraten.

Trotzdem ergaben die 11 Vorversuche, daß die Schwankungen um die Mittelwerte im allgemeinen über 20 bis 30% nicht hinausgehen, und daß sie um so kleiner auszufallen pflegen, je kürzer die durchschnittliche Dauer des Koagulationsprozesses ist. Die Resultate sind im ganzen nicht viel schlechter als die mit der Methode von Morawitz und Bierich[2]) erzielten, die ebenfalls eine Fehlerbreite von 20% besitzt.

Bei Berücksichtigung der geschilderten Kautelen ließ sich wohl erwarten, daß der Zusatz von Stoffen, die mit Blutlipoiden reagieren, verwertbare Ausschläge liefern würde.

Ich ging daher in den folgenden Versuchen so vor, daß ich abgestufte Mengen auf Lipoide wirkender Substanzen den Gesamtblutproben zusetzte.

II. Versuche
mit

A. Gesamtblut und Lipoiden oder lipoidlösenden Stoffen.

1. Die Wirkung von Alkohol absol., Anilin, Essigäther, Aceton.

Die zur Aufnahme der Gerinnungsproben bestimmten Reagensgläser wurden mit 0,05, 0,1, 0,15, 0,25, 0,3 ccm Alkohol absol., Anilin, Essigäther oder Aceton beschickt und dazu je 10 Tropfen Kaninchenblut gelassen. Mehrere Versuche dieser Art ergaben, daß z. B. schon 0,1 ccm Alkohol absol. das Blut in eine sirupöse, himbeerartige Flüssigkeit verwandelte (Hämo-

[1]) Vgl. P. Morawitz, Die Gerinnung des Blutes. Oppenheimers Handb. der Biochemie 2, 2, S. 67 u. 68, 1909.

[2]) P. Morawitz, Die Blutgerinnung. Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden 5, 1, S. 247 u. 248, 1911.

lyse). Die Konsistenzänderung war dabei zweifellos auf die Veränderung der nativen Eiweißstoffe zurückzuführen, so daß die Wirkung der lipoidlösenden Eigenschaft des Alkohols auf die Gerinnung nicht zur Geltung kam. — Aus denselben und anderen Gründen (Methämoglobinbildung usw.) konnte der Einfluß der anderen genannten Stoffe auf die Koagulation nicht rein in die Erscheinung treten.

Es konnten demgemäß für die weiteren Versuche nur solche Stoffe in Betracht kommen, die solcher störenden Nebenwirkungen bar sind. Außer Lipoidlösern kam hier auch Aqua destillata in Betracht, das wie diese, wenn auch auf andere Weise, hämolytisch wirkt.

2. Aqua dest., Äther sulf., Chloroform, Schwefelkohlenstoff, Xylol.

Von diesen lipoidlösenden Stoffen erwiesen sich Schwefelkohlenstoff und Chloroform als nicht verwendbar, da sie spezifisch schwerer sind und sich infolgedessen mit den Gerinnungsproben nicht mischen. Aus analogem Grunde war das spezifisch leichtere Xylol ungeeignet. Ein Einfluß dieser drei Lipoidlöser auf die Gerinnung war daher mit der beschriebenen Versuchsanordnung nicht zu beobachten.

Abgestufte Mengen (wie oben unter „1. Die Wirkung von Alkohol absol. usw." angegeben) von Aqua dest. wurden in ihrer Wirkung mit den entsprechenden Zusätzen von NaCl 0,9 $^0/_0$ verglichen. Kleinere Mengen dieser physiologischen Kochsalzlösung (0,1 bis 0,5 ccm) hatten keinen sichtbaren Einfluß auf die Koagulationszeit; größere, über 0,5 ccm, hemmten durch die starke Verdünnung des Gerinnungssystems. Aqua dest. hatte in diesen Mengen ebenfalls verzögernde Wirkung. Die kleineren Mengen schienen beschleunigend zu wirken. Doch waren die Ausschläge innerhalb der 30 $^0/_0$igen Fehlerbreite der Methode und traten demzufolge auch nicht stets eindeutig in diesem Sinne auf.

Die gleichen Beobachtungen wie mit Aqua dest. wurden beim Zusatz von Aether sulf. gemacht. Mit Blut mischt sich der Äther schlecht.

3. Saponin und ölsaures Natron.

Da die Anwendung lipoidlösender Stoffe zu keinem sicher verwertbaren Ergebnis führte, wurden dann Stoffe geprüft, die ähnlich wie Kobragift mit Blutlipoiden reagieren. Vom Saponin ist bekannt, daß es mit Cholesterin eine Verbindung eingeht. Ich stellte mir also Saponinlösungen von verschiedenem Gehalt (0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,2%) her, und zwar in Aqua dest. und ferner in physiologischer NaCl-Lösung. Von diesen Stammlösungen setzte ich in der wiederholt erwähnten Weise abgestufte Mengen den Gesamtblutproben zu. Die zur Beobachtung gelangenden Gerinnungszeiten verglich ich nicht nur mit denen des Blutes ohne Zusatz, sondern auch mit Blutproben, denen die genau entsprechenden Mengen von Aqua dest. und NaCl-Lösung zugesetzt waren.

Die wäßrige Saponinlösung wirkt natürlich hämolytisch, allein auch die Saponin-Kochsalzlösung tut dies, da Saponin als solches bekanntlich ein Hämolyticum ist.

Ölsaures Natron wurde in steigenden Mengen einer 1%igen Lösung benutzt.

Die erhaltenen Ausschläge gingen auch bei diesen beiden Substanzen nicht recht über die Fehlergrenze des Verfahrens hinaus. Doch ließ sich bei beiden ein leicht hemmender Einfluß auf den Gerinnungsablauf konstatieren.

Nach Stuber und Heim (s. o. S. 13 u. 14) wäre wohl für ölsaures Natron eher eine beschleunigende Einwirkung zu erwarten. Es ist jedoch schon länger bekannt, daß Seifen, wenigstens in stärkerer Konzentration, infolge Fällung der Kalksalze die Gerinnung hemmen[1]). Diese Tatsachen passen schlecht zu der Anschauung dieser beiden Autoren, daß der Koagulationsprozeß eine Kalk-Fettseife-Fibrinogenverbindung sei.

4. Cholesterin und Lecithin in kolloidaler und ätherischer Lösung.

Aus den Literaturangaben ist bekannt, daß von vielen Forschern eine gerinnungsbeschleunigende Rolle des Lecithins behauptet wird. Zak vermutet ferner eine antagonistische Wirkung des Cholesterins.

[1]) Landois-Rosemann, Lehrbuch d. Physiol. d. Menschen, 14. Aufl., 1, 75, 1916.

Ich benutzte zu den folgenden Versuchen aus Gallensteinen hergestelltes Cholesterin und aus Eidotter gewonnenes Lecithin (Ovolecithin). Beide Substanzen kamen in ätherischer und kolloidaler Lösung zum Versuch.

Bei den mit ätherischer Cholesterin- und Lecithinlösung angestellten Untersuchungen war kein Einfluß dieser Substanzen ersichtlich.

Die kolloidale Cholesterinlösung hemmte anscheinend leicht. Davon gibt der folgende Versuch ein Bild.

Der Versuch fand bei Zimmertemperatur von 14°C statt.
Lösung I }
„ II } zwei verschiedene kolloidale Cholesterinlösungen.
Lösung I konzentrierter als Lösung II.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
10 Tr. Blut ohne Zusatz	+ 0,05	+ 0,1	+ 0,2	+ 0,5	+ 1,0	+ 0,05	+ 0,1	+ 0,2	+ 0,5	+ 1,0
	Zusatz von Lösung I					Zusatz von Lösung II				
Min. 12	Min.[1]) 13	Min. 20	Min. 20	Min. 40	Min. 50	Min. 16	Min. 21	Min. 21	Min. 22	Min. 31

12.	13.	14.	15.	16.	17.	Bemerkungen
+ 0,05	+ 0,1	+ 0,2	+ 0,5	+ 1,0	10 Tr. Blut ohne Zusatz	
Zusatz von 0,9%iger NaCl-Lösung						
Min. 12	Min. 13	Min. 13	Min. 18	Min. 17	Min. 9	1) Nach 23 Min. noch nicht so fest wie Probe 1

In den folgenden 2 Versuchen wurde mit Lecithinzusatz gearbeitet.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	
10 Tr. Blut ohne Zusatz	+ 0,05	+ 0,1	+ 0,2	+ 0,5	+ 1,0	+ 0,05	+ 0,1	+ 0,2	+ 0,5	+ 1,0	
	Zusatz von koll. Lecithinlösung					Zusatz von 0,9%iger NaCl-Lösung					
Min.	Min.	Min.	Min.	Min.	Min.	Min.	Min.	Min.	Min.	Min.	
17	18	18	27	28	42	16	17	20	25	25	1. Versuch
19	19	18	16	19	22	11	16	14	18	16	2. Versuch

Im ersten der beiden Lecithinversuche hat es den Anschein, als ob das Lecithin gleich wie das Cholesterin oben gehemmt hätte. Die Gerinnungsdauer der Kontrolle ist aber sehr groß und dementsprechend die Schwankungen um den Mittelwert ebenfalls als beträchtlich zu schätzen. Bei den größeren Zusätzen tritt zudem noch die Verdünnung in Kraft. Der zweite Versuch zeigt ein ähnliches Bild. Immerhin kann festgestellt werden, daß eine eklatante Gerinnungsbeschleunigung, wie sie von vornherein erwartet wurde, nicht auftrat. Es muß jedoch daran erinnert werden, daß es sich um Ovolecithin handelt. Das Ergebnis steht daher im Einklang mit den Beobachtungen von Howell (s. o. S. 6), der gleichfalls bei Ovolecithin eine gerinnungsbeschleunigende Einwirkung vermißte.

In allen bis hierher unternommenen Versuchen war deutlich zu beobachten, wie bedeutend für die Dauer des Koagulationsvorganges und die Schwankungen um die Mittelwerte in den einzelnen Proben eines jeden Versuches die Geschwindigkeit ist, mit der das Blut aus der angeschnittenen Vene tropft. Aber nicht nur die Gerinnungszeit, sondern auch die Festigkeit des entstehenden Blutkuchens zeigte offensichtlich diese Abhängigkeit. Schnelles Fließen bedingte langsame und lockere, langsames Fließen des Blutes rasche und feste Gerinnung.

Es hatte sich ferner gezeigt, daß die zugesetzten Substanzen im allgemeinen die 30 $^0/_0$ ige Fehlerbreite in ihrer Wirksamkeit nicht überschritten. Es mußte also doch eine empfindlichere Methode angewandt werden, und ich entschloß mich daher, nicht mehr mit Gesamtblut, sondern mit künstlich hergestelltem Plasma zu arbeiten, wie es die meisten Untersucher auf diesem Gebiete auch tun.

B. Versuche mit Blutplasma.

1. NaF-Plasma und Lipoide.

Ich benutzte zunächst das NaF-Plasma des Kaninchenblutes[1]). Dieses enthielt auf 1000 Teile Blut 1 bis 1,5 Teile

[1]) Soweit nichts anderes angegeben, wurde in allen folgenden Versuchen Kaninchenblut verwendet.

NaF, d. h. in 0,5 ccm 1 %iger NaF-Lösung wurden 5 ccm Kaninchenblut aufgefangen, gut gemischt und zentrifugiert. Das so erhaltene NaF-Plasma läßt sich durch $CaCl_2$ zur Gerinnung bringen. Da dies Calciumsalz jedoch mit dem Fluorid einen störenden Niederschlag von CaF_2 gibt, zog ich meist die Gerinnungsauslösung durch Serumzusatz vor.

1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5 NaF-Pl. + 0,5 Serum + 0,5 Lec.-Lösg.	= = + 0,5 Chol.-Lösg.	= + 0,5 ÄS + 0,5 NaCl 0,9 %	= = + 0,5 Lec.-Lösg.	= + 0,5 Serum + 0,5 Sap.-Lösg. 2 %	= = + 0,5 Sap.-Lösg. 1 %
75 Min.	85 Min.	6 Std.	Wie 3.	70 Min.	75 Min.

Die Proben wurden in diesem und allen folgenden Versuchen bei Bruttemperatur von meist 35° C gehalten.

Zur Erklärung der Tabelle ist zu sagen: Die wagerechten Striche (=) bedeuten, daß in der betreffenden Probe die in gleicher Höhe in der vorhergehenden Probe stehende Substanz zugesetzt wurde. Bei Lec.-Lösg. und Chol.-Lösg. handelt es sich um kolloidale Lecithin- und Cholesterinlösungen. Ätherische wurden nicht mehr benutzt. Die Buchstaben ÄS bezeichnen ein Serum, das etwa 6 Stunden lang mit der 10fachen Menge Äther[1]), der öfters gewechselt wurde, geschüttelt worden war. Nach der Schüttelbehandlung wurde der Äther abgehoben und die letzten Reste aus dem Serum durch einen Luftstrom entfernt.

1.	2.	3.
0,5 NaF-Pl. + 0,5 Serum + 0,5 NaCl 0,9 %	= = + 0,5 Chol.-Lösg.	= + 0,5 ÄS + 0,5 NaCl 0,9 %
55 Min.	70 Min.	6 Std.

In beiden Versuchen zeigt sich eine leichte Verzögerung des Gerinnungseintrittes bei Cholesterinzusatz. In Anbetracht der langen Gerinnungsdauer der Kontrollen ist sie jedoch nicht erheblich genug, als daß sie für eine spezifische Hemmung durch dieses Lipoid mit Sicherheit verwertbar wäre.

[1]) Wenn hier und fernerhin von Äther die Rede ist, so ist stets Aether sulf. gemeint.

Durch Saponin ist keine deutliche Verlangsamung hervorgerufen worden. Eine sehr ausgesprochene Verspätung der Koagulation trat dagegen ein, wenn das benutzte Serum mit Äther 6 Stunden geschüttelt war. Diese ließ sich auch durch Ovolecithinzusatz nicht beheben.

2. Hirudinplasma und Lipoide.

Weiterhin wurden Versuche mit Hirudinplasma angestellt. Dieses enthielt auf 100 ccm Blut 0,01 g Hirudin. Im folgenden Versuch wurde statt Kaninchen- Kälberblut benutzt.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
0,5 Hir.-Pl. + 0,5 Ser. + 0,5 NaCl 0,9 %	= + 1,0 Ser. =	= = + 0,5 Chol.-Lösg.	= = + 0,5 Lec.-Lösg.	= + 1,0 ÄS + 0,5 NaCl 0,9 %	= = + 0,5 Lec.-Lösg.	= = + 0,5 Chol.-Lösg.
95 Min.	60 Min.	60 Min.	75 Min.	Nach 24 Std. wenig feste Gallerte	Wie 5.	Wie 5.

Der Versuch zeigt, wie die mit NaF-Plasma angestellten, daß bei Verwendung von ÄS eine sehr erhebliche Hemmung des Gerinnungsprozesses erfolgt, die durch Zusatz von Cholesterin- und Lecithinlösung nicht aufgehoben werden kann. Dasselbe veranschaulichen die beiden nächsten Protokolle.

1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,3 Hir.-Pl. + 0,6 Ser. + 0,3 NaCl 0,9 %	= = + 0,3 Chol.-Lösg.	= = + 0,3 Lec.-Lösg.	= + 0,6 ÄS + 0,3 NaCl 0,9 %	= = + 0,3 Lec.-Lösg.	= + 0,6 Ser. =
45 Min.	55 Min.	55 Min.	Nach 48 Std. lockere Gallerte	Wie 4.	70 Min.

Nach der Ansicht von Zak, Bordet und Delange usw. (s. o.) wirken lecithinartige Substanzen thrombokinetisch. Demgegenüber ist die Feststellung von Bedeutung, daß Ovolecithin nicht imstande war, die Hirudinwirkung zu beheben.

1.	2.	3.	4.
0,3 Hir.-Pl. + 0,6 Ser. + 0,3 NaCl 0,9%	= = + 0,3 Chol.-Lösg.	= = + 0,3 Lec.-Lösg.	= = + 0,3 Aceton
30 Min.	45 Min.	35 Min.	Nach 72 Std. Andeutung von Gerinnung

Dieser Versuch bestätigt das Ergebnis der früheren, daß weder Cholesterin stark hemmend, noch Ovolecithin beschleunigend wirkte. Probe 4 mit dem Acetonzusatz wurde so vorgenommen, daß in das Reagensglas zu 0,3 Hirudinplasma 0,3 Aceton gegeben wurde. Dabei trat ein dicker, fleischfarbener Niederschlag auf, der bei nachfolgendem Zusatz von 0,6 Serum jedoch wieder völlig in Lösung ging. Die Wirkung des Acetonzusatzes bestand in einer extremen Gerinnungsverlangsamung.

Zu den weiteren Versuchen wurde Oxalatplasma genommen.

3. Oxalatplasma und Lipoide.

Dieses Oxalatplasma wurde so bereitet, daß dem Blut $^1/_{10}$ Volumen einer 2%igen Natriumoxalatlösung zugesetzt und die Erythrocyten abzentrifugiert wurden. Dabei wurde kein Gewicht darauf gelegt, die Blutplättchen durch besonders scharfes Zentrifugieren mitzuentfernen.

In folgenden 2 Versuchen brachte ich das Plasma durch $CaCl_2$ zur Gerinnung.

1.	2.	3.	4.
0,5 Ox.-Pl. + 0,3 NaCl 0,9% + 0,1 $CaCl_2$-Lösg.	= + 0,3 Chol.-Lösg. =	= + 0,3 Lec.-Lösg. =	= + 0,3 Aceton =
30 Min.	30 Min.	20 Min.	Nach 24 Std. noch ungeronnen

1.	2.	3.
0,5 Ox.-Pl. + 0,3 NaCl 0,9% + 0,1 $CaCl_2$-Lösg.	= + 0,3 Chol.-Lösg. =	= + 0,3 Lec.-Lösg. =
10 Min.	15 Min.	10 Min.

Wieder brachten auch bei Oxalatplasma Cholesterin und Ovolecithin keine wesentliche Änderung der Gerinnungszeit hervor. Es scheint ja in diesen beiden Versuchen einerseits eine leichte Beschleunigung durch Ovolecithin und andererseits Hemmung durch Cholesterin vorzuliegen. Weit übertroffen werden die diesbezüglichen Ausschläge aber durch den Einfluß des Acetons auf den Ablauf der Reaktion. Auch diesmal, bei Oxalatplasma, brachte der Zusatz dieses Stoffes zunächst eine starke, fleischfarbene Trübung im Plasma hervor, die jedoch in kurzem wieder völlig verschwand. Auch hier trat eine *außerordentliche Hemmung durch Aceton* zutage.

In den ferneren Versuchen löste ich die Gerinnung des Plasmas nicht mehr durch $CaCl_2$, sondern durch Serum aus. Dieses wurde teilweise vorher wieder mit Äther 6 bis 8 Stunden unter öfterem Wechsel desselben ausgeschüttelt. Dabei machte ich die Beobachtung, daß nicht jeder Schwefeläther dieselben Wirkungen auf das Oxalatplasma und Serum ausübt. Ich erhielt nämlich einerseits Serum, das durch dieses Ausschütteln mit dem Lipoidlöser zu einer *hellbräunlich tingierten* (Methämoglobin ließ sich nicht darin nachweisen), *etwas dickflüssigen, jedoch absolut klaren Flüssigkeit wurde.* (Im folgenden stets mit 𝔄𝔖 bezeichnet). Andererseits bekam ich bei Verwendung von Narkoseäther und von solchem, der Licht- und Luftzutritt ausgesetzt war, *Niederschläge und Trübungen* in dem behandelten Serum. (Solches Serum heißt im folgenden ÄS.) *Die Wirkung dieser zwei verschiedenen Arten von Serum war entgegengesetzt!*

a) *Gerinnungsbeschleunigung durch* 𝔄𝔖.

Der folgende Versuch zeigt den fördernden Einfluß von 𝔄𝔖 auf den Gerinnungsablauf.

1.	2.	3.	4.	5.	Bemerkung
0,5 Ox.-Pl. + 0,3 Ser.	= + 0,3 𝔄𝔖	= = + 0,1 Chol.-Lösg.	= = + 0,2 Lec.-Lösg.	= = + 0,1 Aeth. sulf.	
24 Std.	1 Min.	1 Min.	1 Min.	24 Std.	Das Oxalatplasma enthielt mehr als 1/10 Vol. 2%iger Natriumoxalatlösung

Das Ergebnis dieses Versuches war äußerst frappant. Bevor die Proben 2, 3, 4 in den Brutschrank gebracht werden konnten, waren sie schon zu einer festen Gallerte erstarrt. Dabei war das Plasma infolge zu reichlichen Oxalatzusatzes noch schwer gerinnbar!

Nach dem Ausschüttelungsprozeß wurden die letzten Ätherreste, wie schon oben erwähnt, durch einen Luftstrom aus dem Serum vertrieben unter gelindem Erwärmen. Daß die enorme Beschleunigung durch ÄS in den Proben 2 bis 4 nicht etwa auf Ätherreste, die noch im Serum verblieben waren, zu beziehen war, folgt aus dem Ausfall der Probe 5.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
0,4 Ox.-Pl. + 0,6 Ser. + 0,5 Aq. (dest.)	= + 0,6 ÄS =	= = + 0,2 Lec.-Lösung + 0,2 Chol.-Lösung + 0,1 Aq.	0,4 ÄPl. + 0,6 Ser. + 0,5 Aq.	= = + 0,2 Lec.-Lösung + 0,2 Chol.-Lösung + 0,1 Aq.	0,4 Ox.-Pl. = + 0,05 Saponin 1% + 0,5 Aq.	= = + 0,2 Saponin 1% + 0,3 Aq.	= = + 0,5 Saponin 1%
40 Min.	1/2 Min.	1/2 Min.	Nach 24 Std. noch ungeronnen		45 Min.	45 Min.	80 Min.

Wieder ergab ÄS eine sehr in die Augen springende Beschleunigung.

Von der Erwägung ausgehend, daß vielleicht die Extraktion der Serumlipoide das gerinnungsförderliche Moment dabei sei, wurde in Probe 3 Cholesterin- und Lecithinlösung zugesetzt (im vorigen Versuche waren diese Substanzen bei Probe 3 und 4 einzeln zugesetzt worden), ohne daß es gelang, die Gerinnung dadurch wieder zu verlangsamen. Dabei wurde diesmal mit besonderer Sorgfalt auf Ätherfreiheit des ÄS hingearbeitet nach dem Schüttelprozeß. In Probe 4 und 5 wurde Oxalatplasma benutzt, das wie sonst das Serum 6 bis 8 Stunden mit öfters erneuerter, 10facher Äthermenge geschüttelt war (ÄPl!). Die Ungerinnbarkeit dieses Plasmas erklärt sich durch Ausfällung von Fibrin (?) bei der Schüttelung mit Äther.

Saponin in größerer Dosis hat etwas gehemmt.

Im nächsten Versuch konnte ich deutlich beobachten, daß ÄS und ÄS ganz verschieden wirkten. ÄS beschleunigte wieder äußerst stark, ÄS dagegen (s. u. S. 29 u. 30) hemmte enorm.

Das zur Ausschüttelung verwendete Serum stammte dabei von ein und demselben Tier, von ein und derselben Entnahme und war überhaupt ganz gleich behandelt worden. Der zur Schüttelung verwendete Äther war offenbar verschiedenartig (s. u. S. 35 f.).

1.	2.
0,4 Ox.-Pl. + 0,6 Ser.	= + 0,6 ÄS
33 Min.	1 Min.

1.	2.	1.	2.	3.	4.
0,5 Ox.-Pl. + 0,5 Ser.	= + 0,5 ÄS	0,5 Ox.-Pl. + 0,5 Ser.	= + 0,5 hämolyt. Ser.	= + 0,5 ÄS	= + 0,5 ÄS hämolyt.
23 Min.	4 Min.	55 Min.	52 Min.	2 Min.	3 Min.

Hämolytische Beschaffenheit des Serums war auch bei ÄS also ohne Bedeutung für die Geschwindigkeit der Reaktion.

Bisher hatte ich nur Kaninchenoxalatplasma angewendet. Ich prüfte jetzt auch das Verhalten anderer Blutarten und fand bei diesen dieselben Verhältnisse. So konnte Kälberoxalatplasma durch ÄS in 1 Minute zur Koagulation gebracht werden. Wurde dieses Plasma 6 bis 8 Stunden mit Äther geschüttelt (ÄPl), so war auch hier die Gerinnung infolge von Fibrin-(?)Ausfällung aufgehoben oder wenigstens sehr beträchtlich gehemmt.

Die zahlenmäßigen Belege für das Verhalten von Ochsenblut gibt folgende Tabelle:

1.	2.
1,0 Ox.-Pl. + 1,0 Ser.	= + 1,0 ÄS
10 Min.	4 Min.

Mit Äther geschütteltes Oxalatplasma war wieder ungerinnbar. Auch beschleunigend wirkendes ÄS hob diese Eigenschaft des vorbehandelten Plasmas nicht mehr auf.

1.	2.
1,0 ÄOx.-Pl. + 1,0 Ser.	= + 1,0 𝔄𝔖
Nach 24 Std. Andeutung von Gerinnselbildung	Ungerinnbar

Auch bei Schweineblut fand ich die bisherigen Beobachtungen bestätigt.

1.	2.	3.
1,0 Ox.-Pl. + 1,0 Ser	= + 1,0 𝔄𝔖	1,0 ÄOx.-Pl. + 1,0 Ser.
120 Min.	5 Min.	Ungerinnbar

Pferdeoxalatplasma wurde durch entsprechend behandeltes Schweineserum analog beeinflußt, desgleichen durch das eigene 𝔄𝔖. Doch war bei Pferdeblut das Pferde-𝔄𝔖 mit fördernder Wirkung etwas schwerer zu erhalten.

1.	2.	1.	2.
1,0 Ox.-Pl. + 1,0 Schweine-Ser.	= + 1,0 Schweine-𝔄𝔖	0,5 Ox.-Pl. + 0,5 Ser.	= + 0,5 𝔄𝔖
15 Min.	6 Min.	$5^1/_2$ Std.	10 Min.

Pferdeoxalatplasma mit Äther geschüttelt verlor, wie auch entsprechend behandeltes Schweineoxalatplasma, seine Gerinnbarkeit.

Auch Hundeoxalatplasma ließ sich durch Schweine-𝔄𝔖 sehr schnell koagulieren.

1.	2.	3.	4.
1,0 Schweine-Ox.-Pl. + 1,0 Schweine-Ser.	= + 1,0 Schweine-𝔄𝔖	1,0 Hunde-Ox.-Pl. =	1,0 Schweine-Ox.-Pl. + 1,0 Schweine-Ser.
4 Std.	2 Min.	1 Min.	4 Std.

Weiter prüfte ich Hammelblut:

1.	2.	1.	2.	3.	4.
0,5 Ox.-Pl. + 0,5 Ser.	= + 0,5 𝔄𝔖	0,5 Ox.-Pl. + 0,5 Ser.	= + 0,5 𝔄𝔖 (1 Tag)	= + 0,5 𝔄𝔖 (2 Tage)	= + 0,5 Pferde-𝔄𝔖
14 Min.	3 Min.	58 Min.	13 Min.	4 Min.	3 Min.

Auch Hammelserum erhielt also durch Ätherausschüttelung stark gerinnungsbeschleunigende Fähigkeit. Bei längerer Behandlung mit dem Lipoidlösungsmittel war sie bedeutender als bei kürzerer. (Im letzten der beiden Versuche bedeutet „1 Tag", „2 Tage" bei Probe 2 und 3, daß das Ausschütteln so lange fortgesetzt wurde.) Probe 4 im letzten Versuch zeigt Gerinnungsbeschleunigung von Hammeloxalatplasma durch Pferde-ÄS.

Sämtliche untersuchte Blutarten (Kaninchen-, Kälber-, Ochsen-, Schweine-, Pferde-, Hunde-, Hammelblut) verhielten sich also gegenüber ÄS gleich, d. h. das aus ihnen dargestellte Oxalatplasma ließ sich durch das völlig klare, etwas dickflüssige, leicht bräunlich gefärbte, 6 bis 8 Stunden mit Aether sulfuricus ausgeschüttelte Serum sehr beschleunigt zur Gerinnung bringen.

b) Gerinnungsverzögerung durch ÄS und PS.

Wie schon oben (S. 25) erwähnt, erhielt ich durch Ätherausschüttelung jedoch nicht immer dieses klare, gerinnungsbeschleunigende Serum, sondern, wie abgeschnitten, von einem bestimmten Zeitpunkt an nicht mehr. Es traten nun bei der Ätherbehandlung im Serum Trübungen und Ausfällungen auf, die verschieden hochgradig waren. Solche ausgeflockte Sera vermochten das Oxalatplasma entweder gar nicht oder doch nur sehr schwer zu koagulieren.

In den folgenden zwei Versuchen kam dies trübe, feinflockig ausgefällte Serum zur Verwendung.

(Es sei daran erinnert, daß, wenn nichts anderes angegeben, Kaninchenblut verwendet wurde.)

1.	2.	3.	4.	5.
0,4 Ox.-Pl. + 0,6 Ser.	= + 0,6 geschüttelt. Ser.	= + 0,1 $CaCl_2$-Lösg.	= + 0,6 ÄS	= + 0,6 PS
40 Min.	40 Min.	11 Min.	72 Std.	Ungerinnbar

1.	2.	3.
0,4 Ox.-Pl. + 0,6 Ser.	= + 0,6 ÄS	= + 0,6 PS
33 Min.	Nach 24 Std. ungeronnen	

In beiden Versuchen tritt eine enorme Verzögerung durch ÄS zutage. Auf den letzten ist schon oben (S. 26 u. 27) hingewiesen worden, da er parallel zu dem dort mitgeteilten, mit Beschleunigung durch ÄS, angestellt und so besonders eindrucksvoll war.

Daß 6stündiges Schütteln des Serums ohne Ätherzusatz für die Gerinnung ohne Belang ist, zeigt Probe 2 im ersten der letzten beiden Versuche. Bekanntlich weiß die Kolloidchemie von einer Schüttelinaktivierung der Fermente. Eine solche war also bei der Wirkung der Ätherbehandlung des Serums nicht im Spiel.

PS in den beiden Versuchen bedeutet ein Serum, das 6 Stunden lang statt mit Schwefeläther mit Petroläther geschüttelt worden war. Bei dieser Prozedur mischt sich der Petroläther sehr innig mit dem Serum, so daß am Schluß eine geleeartige, etwas steife Gesamtmasse resultiert. Aus dieser läßt sich der Petroläther jedoch durch Zentrifugieren wieder abscheiden; es bleibt ein **gleichmäßig** trübes Serum zurück. Durch ihre Gleichmäßigkeit unterscheidet sich diese Trübung scharf von der durch feine oder feinste Flöckchen bedingten des ÄS. Während die des ÄS auf Eiweißfällung zurückzuführen sein dürfte, handelt es sich bei PS um Emulsionierung der Reste des Petroläthers im Serum[1]). Die beiden Versuche ergaben, daß PS außerstande ist, Gerinnung des Oxalatplasmas hervorzurufen.

Vergleichsweise wurde nun auch Serum 6 Stunden mit Chloroform, Schwefelkohlenstoff und Benzol ausgeschüttelt. Denn, handelte es sich bei ÄS und PS um eine Wirkung auf die Serumlipoide, so stand zu erwarten, daß mit diesen 3 Lipoidlösern ähnliche Ergebnisse erzielt werden konnten.

1.	2.	3.	4.
0,5 Ox.-Pl. + 0,5 Ser.	= + 0,5 $CHCl_3$-Ser.	= + 0,5 CS_2-Ser.	= + 0,5 C_6H_6-Ser.
33 Min.	Ungerinnbar		

Durch die 6stündige Schüttelbehandlung mit diesen Stoffen

[1]) Vgl. C. A. Pekelharing, Über den Einfluß von Phosphatiden auf die Blutgerinnung. Zeitschr. f. physiol. Chem. 89, Heft 1/2, S. 22 bis 38, 1914.

erhielt ich dicke, wie Milch aussehende Sera (Eiweißdenaturierung). Sie brachten überhaupt keine Gerinnung mehr hervor.

Pferde- und Schweineoxalatplasma war durch feinflockig getrübtes ÄS ebenfalls nicht zur Gerinnung zu bringen oder wenigstens nur sehr erschwert.

1.	2.	3.	4.	5.
1,0 Pf.-Ox.-Pl. + 1,0 Pf.-Ser.	= + 1,0 Pf.-ÄS	1,0 Pf.-ÄOx.-Pl. + 1,0 Pf.-Ser.	1,0 Schw.-Ox.-Pl. + 1,0 Pf.-Ser.	= + 1,0 Pf.-ÄS
27 Min.	24 Std.	Ungerinnbar	12 Std.	24 Std.

Probe 3 zeigt wieder, daß mit Äther geschütteltes Oxalatplasma seine Gerinnungsfähigkeit durch Fibrin- (?) Verlust völlig verliert.

Hundeblut lieferte mit dem trüben ÄS dasselbe Resultat wie die anderen Blutarten:

1.	2.	3.	4.	5.
1,0 H.-Ox.-Pl. + 1,0 H.-Ser.	= + 1,0 H.-ÄS	1,0 Schweine-Ox.-Pl. =	0,5 Pf.-Ox.-Pl. + 0,5 Pf.-Ser.	= + 0,5 Pf.-ÄS
30 Min.	24 Std.	24 Std.	43 Min.	6 Std.

Es war nun naheliegend, als wirksames Moment bei der Ausschüttelung mit den lipoidlösenden Stoffen wie Äther und Petroläther die Extraktion der Lipoide aus dem Plasma und Serum anzusehen. Wenn diese Erklärung zutraf, war zu erwarten, daß die ätherlöslichen Bestandteile des Serums (im folgenden kurz Serumlipoide = S.-Lip genannt) die Wirkungen der Ätherausschüttelung rückgängig machen konnten. Ich extrahierte also Serumlipoide, um sie meinen Proben zuzusetzen und verfuhr dazu nach folgender gebräuchlichen Methode:

50 g Serum wurden mit etwa der 10fachen Menge 70%igen Alkohols gefällt und in der Wärme 6 bis 8 Stunden damit extrahiert. Dann wurde der Alkohol von dem Niederschlag abgesaugt. Der Niederschlag selbst wurde noch einmal mit der Hälfte des ursprünglichen Quantums Alkohol 96%igen Gehaltes versetzt, nach wieder 6 bis 8 Stunden der Alkohol abgesaugt und mit der 1. Alkoholportion zusammen auf dem Wasserbade verdampft. Es blieb ein gelbbraunes Extrakt zurück. Der so vorbehandelte Serumniederschlag wurde nun einer 24stündigen

Extraktion mit der 10fachen Menge Äthers unterworfen. Dieser Extraktäther, vom Serumniederschlag abfiltriert, wurde zu der nach der Alkoholverdampfung verbliebenen gelbbraunen Masse gegeben, etwa $^1/_2$ Stunde damit digeriert und so diese bis auf einen kleinen ätherunlöslichen Rest in dem Extraktäther gelöst. Der unlösliche Rest wurde abfiltriert, nochmals mit frischem Äther $^1/_4$ Stunde digeriert (der Rest vermindert sich dabei nicht merklich!) und dieser Äther dem Extraktäther beigegeben. Dieser Gesamtäther enthielt nun die ätherlöslichen Substanzen des Serums, soweit sie ausziehbar sind. Er wurde verdampft und ließ die Serumlipoide in Gestalt einer goldgelben, zähen Masse zurück. Aus 50 g Hammelserum ließen sich z. B. auf diese Weise 0,14 g Serumlipoide darstellen.

Ich schüttelte dann in der gewöhnlichen Weise Serum z. B. vom Hammel mit Äther aus und teilte es nach Entfernung des Äthers in 2 gleiche Portionen. Zur einen der beiden wurde von den Serumlipoiden gegeben (die in diesem Falle vom Hammel stammten), und zwar auf 2,5 g Serum etwa 0,05 g. Da aus 50 g Hammelserum 0,14 g Lipoide ausgezogen werden konnten, so handelte es sich bei diesem Zusatz nicht um Wiederherstellung des etwaigen früheren Lipoidgehaltes des Serums, sondern um einen erheblichen Überschuß. Beide ÄS-Portionen, die mit und die ohne diesen Zusatz, wurden nun noch einmal 2 Stunden lang geschüttelt, um in der einen die zugesetzten Lipoide gut zu emulgieren, und um die andere unter dieselben Versuchsbedingungen gebracht zu haben. Es konnte so eine feine Verteilung der zugefügten Fettsubstanzen leicht erzielt werden: das Serum war nach der 2stündigen Einschüttelung gleichmäßig milchig getrübt. Das Ergebnis der nun angestellten Gerinnungsprobe zeigt folgendes Protokoll:

1.	2.	3.
0,5 Ox.-Pl. + 0,5 Ser.	= + 0,5 ÄS	= = + S-.Lip.
105 Min.	Nach 72 Std. noch ganz ungeronnen	

Das Hammelplasma enthielt diesmal etwas mehr Oxalat als sonst; daher wohl die langsame Gerinnung der Kontrolle. ÄS hat sehr stark verzögert, entsprechend seiner feinflockigen

Trübung. Die Serumlipoide haben diese Gerinnungshemmung nicht rückgängig machen können.

Im nächsten Versuch handelt es sich um Kaninchenblut und daraus gewonnene Serumlipoide.

1.	2.	3.	4.
0,5 Ox.-Pl. + 0,5 Ser.	= + 0,5 ÄS	= = + S.-Lip.	= + 0,5 Ser. + S.-Lip.
43 Min.	Ungerinnbar		2 Std.

ÄS war in diesem Versuche überhaupt außerstande, das Plasma zu koagulieren. Daran hat wieder der Lipoidzusatz nichts geändert. Im Gegenteil, Probe 4 zeigt, daß Serumlipoide bei Einschüttelung in nicht mit Äther vorbehandeltes Serum selbst nicht unerheblich hemmen.

Vergleichsweise wollte ich noch einmal prüfen, ob ÄS auf NaF- und $MgSO_4$-Plasma ebenso wirkt wie auf Oxalatplasma.

1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5 Ox.-Pl. + 0,5 Ser.	= + 0,5 ÄS	0,5 ÄOx.-Pl. + 0,5 Ser.	0,5 NaF-Pl. + 0,5 Ser.	= + 0,5 ÄS	0,5 ÄNaF-Pl. + 0,5 Ser.
8 Min.	6 Std.	Ungerinnbar	7 Min.	6 Std.	Ungerinnbar

7.	8.	9.
0,5 $MgSO_4$-Pl. + 0,5 Ser.	= + 0,5 ÄS	0,5 Ä$MgSO_4$-Pl. + 0,5 Ser.
2 Std.	Ungerinnbar	

In diesem Versuch handelte es sich um Ochsenblut und die daraus gewonnenen Reagentien.

Sämtliche 3 Plasmata erwiesen sich in ihrem Verhalten gleich. Das stark getrübte ÄS hat erheblich gehemmt, ÄPl war durch Fibrin- (?) Verlust ungerinnbar.

1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5 Ox.-Pl. + 0,5 Ser.	= + 0,5 ÄS	0,5 NaF-Pl. + 0,5 Ser.	= + 0,5 ÄS	0,5 $MgSO_4$-Pl. + 1,0 Ser.	= + 1,0 ÄS
9 Min.	Ungerinnbar	9 Min.	Wie 2.	24 Std.	Wie 2.

Also, eine Bestätigung der im vorigen Versuch gefundenen Verhältnisse.

In diesen 2 letzten Versuchen fiel mir nun auf, daß die Trübung des ÄS besonders stark und dicht war. Das brachte mich auf den Gedanken, daß wohl Äther und Äther nicht dasselbe sei. Auch die früher durch ÄS erhaltenen Gerinnungsbeschleunigungen waren in diesem Sinne vielleicht verständlich. Ich hatte zu den Versuchen Äther, der bei meist schnellem Verbrauche im Laboratorium in hellen Glasflaschen gehalten wurde, benutzt. Ich nahm jetzt Äther, der in brauner, gut verschlossener Flasche aufbewahrt wurde, und schüttelte damit eine Probe des im letzten Versuche verwendeten Serums. Der Unterschied war eklatant. Während ich jetzt nur eine leichte, feinflockige Trübung im Serum erhielt, war im vorigen Versuche, wie schon erwähnt, eine kräftige Denaturierung offenbar des Serumeiweißes erfolgt. Es war also, da ein und dasselbe Serum diese verschiedenen Resultate ergab, mit Sicherheit der Äther und nicht das Serum, das den verschiedenen Ausfall der Schüttelprozedur bedingte. Allem Anschein nach gingen in dem Laboratoriumsäther, wenn er längere Zeit Licht- und Luftzutritt ausgesetzt war, Umsetzungen vor sich.

Ich stellte nun eine gewisse Äthermenge absichtlich in offener, heller Flasche in das Sonnenlicht und beließ sie dort mehrere Tage lang. Dann schüttelte ich damit Serum aus. Eine 2. Probe desselben Serums wurde mit Aether purissimum pro narcosi behandelt. Der Unterschied war ganz enorm. Die 1. Probe wurde während des Schüttelns zu einer grauweißen, dicken Masse (Eiweißfällung), die 2. blieb beim Schütteln klar und zeigte erst nach Vertreiben der letzten Ätherreste eine feinstflockige, nur bei scharfem Betrachten erkennbare Trübung.

Die stark veränderte 1. Probe rief keine Koagulation mehr hervor. Die 2., mit Narkoseäther behandelte, verhielt sich folgendermaßen:

1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5 Hammel-Ox.-Pl. + 0,5 Ser.	= + 0,5 ÄS	0,5 Kaninchen-Ox.-Pl. + 0,5 Ser.	= + 0,5 ÄS	0,5 Kaninchen-NaF-Pl. + 0,5 Ser.	= + 0,5 ÄS
51 Min.	5 Std.	35 Min.	6 Std.	6 Min.	30 Min.

Also auch dieses Serum hemmte infolge seiner, wenn auch leichten Trübung deutlich.

Es stand nach alledem nun fest, daß zur Prüfung der reinen Ätherwirkung nur Aether purissimum pro narcosi brauchbar war.

Die Beobachtung, daß Äther, der Licht- und Lufteinwirkung ausgesetzt ist, stark eiweißfällend auf Serum beim Schütteln wirkt, steht wohl im Einklang mit der Forderung der Chirurgen, daß zur Inhalation nur Aether purissimum pro narcosi zu verwenden ist. Der ohne die hierfür geltenden Vorsichtsmaßregeln hergestellte und aufbewahrte Äther wirkt infolge seiner eiweißfällenden Fähigkeit ätzend auf die Schleimhäute.

Bevor die weiteren, nur mit Narkoseäther und Petroläther angestellten Versuche mitgeteilt werden sollen, dürfte eine kurze Betrachtung über die verschiedenen Wirkungen der Ätherausschüttelung und ihre mutmaßlichen Ursachen angebracht sein.

Wie oben dargestellt, erhielt ich in einer sehr erheblichen Anzahl von Versuchen durch Ätherbehandlung während einer bestimmten Zeit absolut klare, beschleunigend wirkende Sera. Ich war zunächst der Meinung, daß das die reine Ätherwirkung auf Serum sei. Erst als ich fernerhin stets Trübungen der Sera erhielt, und besonders als auch der Narkoseäther, aus dem Serum vertrieben, eine allerdings feinstflockige Trübung hinterließ, mußte diese Ansicht fallen. Da ich die Beschleunigung nur in einem ganz scharf umschriebenen Zeitraum in aufeinanderfolgenden Versuchen, bei den verschiedensten Blutarten und bei im übrigen durchaus gleichen Versuchsbedingungen wie für das später stets erhaltene verzögernd wirkende ÄS sah, bleibt als Erklärung, daß der Äther, der für das Institut in großen Ballons bezogen wurde, aus dem in der genannten Zeitspanne zur Verfügung stehenden Ballon von besonderer Beschaffenheit war. Spezielle physikalische oder chemische Verhältnisse in diesem Äther waren offenbar die Ursache, daß die reine Ätherwirkung, die Narkoseäther zeigt, aufgehoben und verschleiert war. Anders ist das periodische Auftreten der Beschleunigung durch das ÄS kaum zu verstehen. Die Möglichkeit, daß in dem ausgeschüttelten Serum besondere Verhältnisse vorlagen, die dazu führten, daß es nach der Ätherbehandlung klar blieb und gerinnungsfördernde Eigen-

schaften angenommen hatte, ist ganz und gar unwahrscheinlich, da ja in jedem Versuch das Serum eines anderen Tieres, zum großen Teil auch noch anderer Gattung, genommen wurde. Noch deutlicher spricht aber in diesem Sinne der oben S. 27, 29 u. 30) mitgeteilte Versuch, wo in ein und demselben Serum mit den beiden verschiedenen Ätherarten entgegengesetzte Resultate erhalten wurden. Auf etwaige Abgabe von Stoffen aus den zum Versuch benutzten Geräten (Glas, Kork) an das geschüttelte Serum kann die Erscheinung, wie dahingehende Versuche (mit Jenaer Glas und Zusatz von ätherischen Extrakten aus Kork [im Kork kommt ein Lipoid namens Phytosterin vor!] zu Serum) ergaben, wohl ebenfalls nicht zurückgeführt werden.

Es bleibt daher als höchstwahrscheinlich bestehen, daß besondere Beschaffenheit des benutzten Äthers [vielleicht von der Herstellung herrührende Nebenprodukte bestimmter Art[1])] die zeitweise auftretende Gerinnungsbeschleunigung durch ÄS bedingte.

Daß grobflockige Ausfällung der Eiweißstoffe, wie sie Luft- und Lichtwirkung ausgesetzter Äther bedingte, dem Serum seine gerinnungsauslösenden Fähigkeiten nimmt, ist leicht verständlich. Luft und Licht aber verändern und zersetzen Schwefeläther. Das konnte ich selbst beobachten, und darüber schreibt E. Schmidt[2]): „Gegen Oxydationsmittel verhält sich der Äthyläther widerstandsfähiger als der Äthylalkohol. Jedoch werden geringe Mengen davon durch Sauerstoff der Luft schon bei gewöhnlicher Temperatur allmählich zu Aldehyd, Essigsäure und Ameisensäure oxydiert. Gleichzeitig entstehen kleine Mengen von Wasserstoffsuperoxyd, Vinyläther $C_2H_3OC_2H_3$, Vinylalkohol C_2H_3OH und Äthylperoxyd $(C_2H_5)_2O_2$ (?). Infolge dieser Veränderungen nimmt der Äthyläther allmählich eine schwach saure Reaktion an, wenn er längere Zeit in Luft enthaltenden Flaschen aufbewahrt wird. Ferner übt solcher Äther eine oxydierende Wirkung aus."

Von solchem durch Luft- und Lichtwirkung zersetzten

---

[1]) Siehe darüber E. Schmidt, Ausführl. Lehrb. d. pharmazeut. Chemie. II. Bd., Organische Chemie, 1. Abt., 5. Aufl. Braunschweig 1910.

[2]) l. c. S. 328.

Schwefeläther ist der Narkoseäther, der auch Gerinnungshemmung hervorrief, zu trennen. Während bei jenem die massive Eiweißfällung zum allergrößten Teil auf das Konto der Zersetzungsprodukte kommt und je nach der Menge derselben verschieden stark ist, erhält man durch den absolut reinen Narkoseäther selbst das stets gleiche Resultat einer feinstflockigen Trübung des damit geschüttelten Serums. Dadurch geht dem Serum offensichtlich ein wichtiger Gerinnungskörper verloren. Das zeigen meine Versuche. Und der Verlust dieses Stoffes und die dadurch bedingte Störung des ganzen Systems allein, ohne Fällung der ganzen Serumeiweißkörper, reicht hin, um diesem seine gerinnungsauslösende Kraft zu nehmen. Wodurch die feinstflockige Trübung bedingt ist, läßt sich nicht mit Bestimmtheit sagen. Es wäre daran zu denken, daß die Entziehung der Lipoide durch die Ätherbehandlung das ursächliche Moment sei. Dabei würden dann die Serumlipoide vielleicht als Schutz- oder Stützkolloide für einen zur Gerinnung erforderlichen Eiweißkörper figurieren, der bei ihrem Fehlen ausfällt. Eine sichere Stütze für diese Auffassung geben meine Versuche nicht, denn nachträglicher Zusatz von Serumlipoiden zu ÄS stellte die gerinnungsauslösenden Eigenschaften des Serums nicht wieder her. Andererseits spricht diese Tatsache aber auch keineswegs gegen diese Erklärung, denn es kann sich bei dieser feinstflockigen Ausfällung um eine irreversible Reaktion handeln. Zudem ist die Art des nachträglichen Zusatzes der Lipoide auch eine so grobe Manipulation, daß, wie leicht einzusehen, eine Wiederherstellung des einmal gestörten, vorher fein abgestimmten kolloidalen Systems dadurch nicht zu erfolgen braucht. Das so zugesetzte Lipoidquantum wirkt infolgedessen wie ein Fremdkörper und hemmt dadurch sogar die Koagulation.

Jedenfalls entspricht es dem Sachverhalt, daß Lipoidextraktion durch Ätherausschüttelung[1]) und feinstflockige Trübung im Serum gleichzeitig erfolgen. Ein Zusammenhang ist zum mindesten möglich. —

---

[1]) Wie weit eine solche wirksam ist, siehe bei L. Wacker und W. Hueck, Chemische und morphologische Untersuchungen über die Bedeutung des Cholesterins im Organismus. IV. Arch. f. exper. Pathol. und Pharmakol. 74, 419, 1913.

In den folgenden Versuchen verwendete ich nur Narkoseäther und Petroläther und suchte die Wirkungen der Serumlipoide im ganzen und in einzelne Fraktionen zerlegt näher zu studieren. Es kam dazu nur Rinderblut in Verarbeitung.

1.	2.	3.	4.	5.
0,5 Ox.-Pl. + 0,5 Ser. + 0,2 Aq.	= + 0,5 ÄS =	= = + 0,2 S.-Lip. 2 %	= + 0,5 Ser. + 0,05 S.-Lip. 2 %	= = + 0,1 =
6 Min.	nach 48 Std. noch ungeronnen		7 Min.	9 Min.

6.	7.	8.	9.	10.
= = + 0,2 =	0,5 NaF-Pl. = + 0,2 Aq.	= + 0,5 ÄS =	= = + 0,2 S.-Lip. 2 %	= + 0,5 Ser. =
12 Min.	5 Min.	48 Std.	nach 48 Std. noch ungeronnen	9 Min.

Wieder vermochte ÄS keine Gerinnung zu bewirken. Nachträglicher Serumlipoidzusatz in 2 %iger wässeriger Emulsion änderte daran nichts. Aus den nach dem oben (S. 31 u. 32) beschriebenen Verfahren gewonnenen Lipoidsubstanzen ließ sich durch kräftiges Schütteln mit Aqua destillata eine solche Emulsion leicht herstellen. Die Wirkung der Serumlipoidemulsion selbst war eine leichte Hemmung (s. Probe 4, 5, 6, 9 und 10). Diese Tatsache ist immerhin bemerkenswert, besonders mit Rücksicht auf die Anschauung von der Lipoidnatur der Thrombokinase, speziell auch im Hinblick auf die Ergebnisse mit Fett- und Fettsäurezusätzen von Stuber und Heim. Gegen die Theorie dieser beiden Autoren habe ich schon oben auf Grund meiner Ergebnisse mit ölsaurem Natron Bedenken erhoben (s. S. 19).

Vergleichsweise wurde das die gleichen Verhältnisse zeigende NaF-Plasma im letzten Versuch zugezogen.

Die Eigenhemmung eines großen Lipoidgehaltes der Gerinnungsproben suchte ich im nächsten Versuch dadurch noch deutlicher zu machen, daß mit größeren Verdünnungen gearbeitet wurde.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
0,3 Ox.-Pl. + 0,3 Ser. + 0,4 Aq.	= = + 0,1 S.-Lip. 2 % + 0,3 Aq.	= = + 0,2 = + 0,2 =	= = + 0,4 =	0,3 NaF-Pl. = + 0,4 Aq.	= = + 0,1 S.-Lip. 2 % + 0,3 Aq.	= = + 0,2 = + 0,2 =	= = + 0,4 =
8 Min.	10 Min.	19 Min.	25 Min.	5 Min.	6 Min.	12 Min.	14 Min.

Das Ergebnis bestätigt den vorigen Versuch in noch deutlicherer Weise. Bei steigender Menge der zugesetzten Lipoidemulsion zeigt sich zunehmende Gerinnungshemmung.

1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,3 Ox.-Pl. + 0,3 Ser. + 0,4 Aq.	= + 0,3 ÄS =	0,3 NaF-Pl. = =	= + 0,3 Ser. =	0,3 Ox.-Pl. + 0,3 ÄS + 0,4 S.-Lip. 2 %	0,3 NaF-Pl. = =
4 Min.	ungerinnbar		4 Min.	ungerinnbar	

7.	8.	9.	10.
0,3 POx.-Pl. + 0,3 Ser. + 0,4 Aq.	= = + 0,4 S.-Lip. 2 %	0,3 Ox.-Pl. + 0,3 PS. + 0,4 Aq.	0,3 Ox.-Pl. + 0,3 PS. + 0,4 S.-Lip. 2 %
15 Min.	50 Min.	45 Min.	nach 24 Std. noch flüssig.

ÄS hat die Gerinnung sowohl bei Oxalat- wie bei NaF-Plasma (Probe 2 und 3) aufgehoben. 2 %ige wässerige Serumlipoidemulsion hat das wieder nicht rückgängig machen können (Probe 5 und 6). In Probe 7 kam Oxalatplasma, das mit Petroläther 2 Stunden geschüttelt war (POx.-Pl.), zum Versuch, mit dem Ergebnis, daß gegenüber unbehandeltem Oxalatplasma eine Gerinnungsverlangsamung um etwa das Vierfache eintrat. Serumlipoide machten diese Verzögerung im POx.-Pl. nicht nur nicht rückgängig, sondern verstärkten sie noch ganz bedeutend (Probe 8)! Zak hatte, wie erinnerlich, durch Rinderhirnphosphatide im Gegensatz hierzu die durch Petrolätherausschüttelung bedingte Ungerinnbarkeit des Oxalatplasmas aufheben können! In meinem Versuch war POx.-Pl. nicht gerinnungsunfähig, sondern nur schwer koagulierbar, offenbar infolge der nur kurz währenden Petrolätherbehandlung.

PS hat ebenfalls nur stark verzögert koaguliert; auch hier war Serumlipoidzusatz nicht imstande, einen Umschwung zu veranlassen (Probe 9 und 10).

Der folgende ausgedehnte Versuch bestätigte diese Ergebnisse.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
0,3 Ox.-Pl. + 0,3 Ser. + 0,4 Aq.	= = + 0,1 S.-Lip. 2% + 0,3 Aq.	= = + 0,2 = + 0,2 =	= = + 0,4 =	0,3 NaF-Pl. = + 0,4 Aq.	= = + 0,1 S.-Lip. 2% + 0,3 Aq.	= = + 0,2 = + 0,2 =
23 Min.	38 Min.	38 Min.	48 Min.	22 Min.	24 Min.	29 Min.

8.	9.	10.	11.	12.	13.
= = + 0,4 =	0,3 POx.-Pl. = + 0,4 Aq.	= = + 0,1 S.-Lip. 2% + 0,3 Aq.	0,3 POx.-Pl. + 0,3 Ser. + 0,2 S.-Lip. 2% + 0,2 Aq.	= = + 0,4 =	0,3 Ox.-Pl. + 0,3 PS + 0,4 Aq.
36 Min.	120 Min.	120 Min.	120 Min.	200 Min.	20 Min.

14.	15.	16.	17.	18.	19.
= = + 0,1 S.-Lip. 2% + 0,3 Aq.	= = + 0,2 = + 0,2 =	= = + 0,4 =	0,3 PNaF-Pl. + 0,3 Ser. + 0,4 Aq.	= = + 0,4 S.-Lip. 2%	= + 0,3 PS + 0,4 Aq.
22 Min.	22 Min.	47 Min.	20 Min.	20 Min.	20 Min.

Zu dem abweichenden Ausfall der Proben 13 bis 19 ist zu bemerken, daß das in ihnen verwendete PS und PNaF-Pl. nicht genügend lange mit Petroläther geschüttelt wurde. Es kam daher bei dem Serum sowohl wie dem NaF-Plasma nicht zu der oben geschilderten (S. 30) geleeartigen Konsistenz und innigen Mischung der Schüttelmassen, sondern Serum und NaF-Plasma blieben klar und leichtflüssig und vom Petroläther scharf getrennt. Es gelang unter Berücksichtigung dieses ausschlaggebenden Momentes in weiteren Versuchen leicht, auch bei PNaF-Pl. die für POx-Pl. geltenden Gesetzmäßigkeiten festzustellen.

Bisher hatte ich nur Serumlipoide extrahiert und ihren Einfluß auf die Blutgerinnung geprüft. Ich gewann nun aus

defibriniertem Rinderblut die Lipoide, und zwar 1. aus dem Serum, 2. aus den Erythrocyten, 3. aus dem Gesamtblut.

ad 1. etwa 1 l Serum wurde in der oben (S. 31 u. 32) dargelegten Weise extrahiert.

ad 2. Die Erythrocyten wurden aus dem defibrinierten Blut durch Abzentrifugieren und gründliches Waschen mit Kochsalzlösung gewonnen. Dann wurde wie bei der Serumextraktion mit ihnen verfahren. Dabei war das 1. Alkoholextrakt stark burgunderrot gefärbt und enthielt das Hämoglobin. In den Ätherauszug ging dieses nicht über.

ad 3. Mit dem Gesamtblut wurde wie mit Serum verfahren.

Es war denkbar und durch die Versuche von Zak wahrscheinlich gemacht, daß die Lipoide der Erythrocyten und des Serums verschieden auf die Gerinnung wirken könnten. Die nächsten Versuche sollten darüber Aufschluß geben. Alle 3 Extrakte (S.-Lip. = Serumlipoide, Er.-Lip. = Erythrocytenlipoide, Bl.-Lip. = Lipoide des Gesamtblutes) mußten dazu wieder in 2°/$_0$ ige wässerige Emulsion gebracht werden, was durch kräftiges Schütteln leicht gelang.

Die Emulsion von S.-Lip hatte eine eigelbe Farbe,
" " " Er.-Lip " " grauweiße Farbe,
" " " Bl.-Lip " " milchkaffeeartige Farbe.

Diese 3 Emulsionen wurden den Gerinnungsproben im folgenden Versuch zugesetzt.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
0,5 Ox.-Pl. + 0,5 Ser. + 0,4 Aq.	= = + 0,3 Aq. + 0,1 S.-Lip.	= = + 0,2 = + 0,2 =	= = + 0,4 =	= = + 0,3 Aq. + 0,1 Er.-Lip.	= = + 0,2 = + 0,2 =	= = + 0,4 =
7 Min.	7 Min.	7 Min.	15 Min.	7 Min.	7 Min.	7 Min.

8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.
= = + 0,3 Aq. + 0,1 Bl.-Lip.	= = + 0,2 = + 0,2 =	= = + 0,4 =	0,5 POx.-Pl. = + 0,4 Aq.	= = + 0,4 S.-Lip.	= = + 0,4 Er.-Lip.	= = + 0,4 Bl.-Lip.
17 Min.	27 Min.	27 Min.	20 Min.	20 Min.	20 Min.	80 Min.

Das Resultat also:

Serumlipoide hemmten leicht.

Erythrocytenlipoide hatten keinen Einfluß.

Blutlipoide hemmten gleichfalls.

Die Gerinnungsverzögerung des POx-Pl. konnte durch keine der 3 Emulsionen zurückgebildet werden!

Jedenfalls hat also keine der Emulsionen beschleunigend gewirkt. Nach den Ergebnissen Zaks war das nicht zu erwarten. Allerdings hat er Rinderhirnphosphatide und nicht Blutlipoide für seine Versuche benutzt! Hirnlipoidemulsion und Blut- oder Serumlipoidemulsion sind aber sicher verschieden zusammengesetzt, zum mindesten mit Rücksicht auf die Prozentverhältnisse der einzelnen Bestandteile.

Bei der Schilderung des Extraktionsverfahrens (S. 31 u. 32) ist angegeben, daß bei der Lösung des gelb-braunen Alkoholextraktes in Äther ein „unlöslicher Rest“ verbleibe. Bei der Extraktion der Erythrocyten und des Gesamtblutes fand sich ebenfalls ein solcher.

Aus diesem „Rest“ ließ sich durch kräftiges Schütteln mit Aqua destillata eine Emulsion bilden, die im folgenden Versuch zur Verwendung kam.

Die Emulsion aus dem „ungelösten Rest“ bei der Serumextraktion heiße *S*, die mit dem bei der Erythrocytenextraktion gewonnene *E*.

Beide reagierten auf Lackmus neutral.

1.	2.	3.	4.	5.
0,5 Ox.-Pl. + 0,5 Ser. + 0,4 Aq.	= = + 0,2 *S* + 0,2 Aq.	= = + 0,2 *S* + 0,2 *S*-Lip.	= = + 0,2 Aq. + 0,2 *E*	= = + 0,2 Er.-Lip. + 0,2 *E*
17 Min.	17 Min.	18 Min.	23 Min.	23 Min.

S hat keinen Einfluß auf die Gerinnungsdauer gezeigt *E* vielleicht ein wenig gehemmt. Jedenfalls bei beiden keine Beschleunigung.

Ich ging nun noch daran, Serumlipoide aufzuarbeiten und die einzelnen Fraktionen zu verwenden.

Die Schwierigkeiten waren dabei groß, wenn man bedenkt, daß Rinderserum durchschnittlich etwa 0,4 % Lipoidsubstanzen

enthält. Die durch Extraktion zu erzielenden Lipoidmengen waren demgemäß absolut genommen immer nur sehr gering. Bei weiterer Trennung in die einzelnen Bestandteile wurden die gewonnenen Mengen naturgemäß immer noch kleiner, besonders auch durch Verluste infolge Gebrauches mehrerer Gefäße.

Die extrahierten Serumlipoide bilden (s. S. 32) eine zähflüssige, im ganzen goldgelbe Masse, die aber nicht etwa ein gleichmäßiges Gemisch darstellt. An der Oberfläche finden sich nämlich einige ölige, rote Tropfen von flüssiger Konsistenz. Diese entfernte ich von dem übrigen Extrakt jetzt mechanisch und emulgierte sie durch Schütteln mit Aq. dest. = Emulsion I.

Die Emulsion der Serumlipoide vermindert um diese ölige Substanz ist = Emulsion II.

Nach dem Vorgehen von Zak suchte ich ferner durch Acetonfällung aus meinen Serumlipoiden die acetonunlöslichen abzusondern.

Zu diesem Zwecke löste ich extrahierte Serumlipoide in Petroläther wieder auf und gab zu dieser Lösung Aceton[1]) Der entstehende Niederschlag wurde abfiltriert und ein Teil davon mit Aq. dest. emulgiert = Emulsion III.

Der Rest des so gewonnenen Niederschlages wurde wieder in Petroläther gelöst und dann ein 2. und 3. Mal mit Aceton ausgefällt. Aus den bei der ersten Acetonfällung in Lösung gebliebenen Lipoiden wurde nun nach Verdunsten des Lösungs mittels die wässerige Emulsion IV, aus den bei der 2. und 3. Acetonfällung nicht niedergeschlagenen auf die gleiche Weise Emulsion V hergestellt.

1.	2.	3.	4.	5.	6.
0,5 Ox.-Pl. + 0,5 Ser. + 0,4 Aq.	= = + 0,4 I	= = + 0,4 II	= = + 0,4 III	= = + 0,4 IV	= = + 0,4 V
20 Min.	21 Min.	60 Min.	32 Min.	20 Min.	20 Min.

7.	8.	9.	10.
0,5 POx.-Pl. = + 0,4 Aq.	= = + 0,4 III	0,5 Ox.-Pl. + 0,5 PS. + 0,4 Aq.	= = + 0,4 III
32 Min.	34 Min.	3 Std.	4 Std.

[1]) Nach W. Klein und L. Dinkin, Beiträge zur Kenntnis d. Lipoide d. menschl. Serums u. zur Methodik d. Lipoidbestimmung, Zeitschr. f.

Das Ergebnis des Versuches:

Emulsion I hat keine Wirkung gezeigt.
" II hat deutlich gehemmt.
" III hat gehemmt!! (phosphatidhaltige Fraktion!)[1]).
" IV hat keine Wirkung gehabt.
" V hat keine Wirkung gehabt.

Wie Proben 7 bis 10 zeigen, konnte durch die phosphatidhaltige Emulsion III die Wirkung der Petrolätherbehandlung auf Oxalatplasma und Serum nicht rückgängig gemacht werden! Wichtig ist ferner die Feststellung, daß keine der aus den Blutlipoiden gewonnenen Emulsionen beschleunigt hat.

Im nächsten Versuch wurde noch der bei der 3. Acetonfällung erhaltene Niederschlag verwendet als Emulsion VI, und im übernächsten außer Emulsion III (1. Acetonfällung) und Emulsion VI (3. Acetonfällung) noch Emulsion VII (2. Acetonfällung).

1.	2.	3.
0,5 Ox.-Pl. + 0,5 Ser. + 0,4 Aq.	= = + 0,4 S.-Lip.	= = + 0,4 VI
14 Min.	14 Min.	14 Min.

Also auch der bei der 3. Acetonfällung erhaltene Niederschlag in Form der

Emulsion VI hat keine Wirkung gehabt.

Wichtig ist auch hier wieder das Fehlen eines beschleunigenden Einflusses.

Die Serumlipoide (S.-Lip.) haben diesmal nicht merklich gehemmt. Daß die durch sie bedingte Verzögerung nicht stets gleich stark auftritt, erklärt sich wohl zwanglos daraus, daß

---

physiol. Chem. 92, Heft 4/5, 1914, S. 302ff., werden die ätherlöslichen Bestandteile des Serums durch mehrmalige Acetonfällung in einen phosphatidhaltigen, acetonunlöslichen Teil und einen das freie und gebundene Cholesterin enthaltenden acetonlöslichen Teil getrennt. Als ständige Begleitsubstanz des Phosphatids tritt ein jekorinartiger Stoff auf.

[1]) Es ist hier der Ort, darauf hinzuweisen, daß auch die von Fränkel und Thiele (s. o. S. 13) aus ätherischen Rinderherzextrakten durch Aceton gefällten Phosphatide durchaus keine cytozymatische Wirkung hatten.

der Lipoidgehalt des Blutes der Schlachthaustiere ja keineswegs in seiner Gesamtmenge und Zusammensetzung eine konstante Größe darstellt[1]).

1.	2.	3.	4.	5	6.	7.
0,5 Ox.-Pl. + 0,5 Ser. + 0,4 Aq.	= = + 0,4 S.-Lip.	= = + 0,4 VI	= = + 0,4 III	= = + 0,4 VI + VII	= = + 0,4 III	= = + 0,4 VI + VII
10 Min.	12 Min.	10 Min.	10 Min.	9 Min.	10 Min.	9 Min.

In diesem Versuch wurde also noch einmal die Wirkung des 1., 2. und 3. Acetonniederschlages geprüft (Emuls. III, VII und VI). Probe 6 und 7 enthält dieselben Bestandteile wie 4 und 5; doch sind die in ihnen verwendeten Emulsionen von den Serumlipoiden eines anderen Rindes erhalten als die in Probe 4 und 5.

Auch dieser Versuch ergab keine beschleunigende Wirkung eines der Acetonfällungsprodukte.

Nach diesen Ergebnissen dürfte es wohl berechtigt sein, die Anschauung von Zak (s. o. Einleitung), daß Lipoidverarmung des Oxalatplasmas nach Petrolätherbehandlung das gerinnungshemmende Moment sei, als nicht sicher fundiert zu bezeichnen. Zak wurde, wie bekannt, in dieser Ansicht bestärkt dadurch, daß es ihm gelang, in solchem Plasma durch Rinderhirnphosphatidzusatz die Gerinnbarkeit wiederherzustellen. Schon Bordet und Delange[2]) gaben zu, daß dieser Schluß nicht zwingend sei, während Rumpf (s. o.) meinte, zugestehen zu müssen, daß Lipoidarmut verlangsamend wirke. Pekelharing (s. o.) wies dann direkt nach, daß auch ohne Lipoidzusatz das mit Petroläther ausgeschüttelte Plasma wieder gerinnbar gemacht werden könne, einfach durch exaktes Vertreiben der letzten Petrolätherreste aus dem Schüttelprodukt. Wäre Zaks Ansicht voll zutreffend, so hätte durch Zusatz der Blutlipoide zu dem „lipoidarmen“ POx.-Pl. die Gerinnung am ehesten wiederhergestellt werden müssen. Daß dies, wie meine Versuche zeigen, nicht

[1]) Vgl. P. Morawitz, Blutplasma und Blutserum. Oppenheimers Handb. d. Bioch. 2, 2, S. 88, 1909.

[2]) J. Bordet u. L. Delange, La question du rôle des lipoides dans la coagulation du sang. Berl. klin. Wochenschr. 51. Jg., Nr. 11, 1914, 497ff.

gelingt, spricht entschieden für eine spezifische Wirkung der Rinderhirnphosphatide Zaks. Auch die Tatsache, auf die Klein und Dinkin[1]) hinweisen, daß nämlich die Lipoidlöser Alkohol, Äther, Aceton, Petroläther in absteigendem Maße zur Lipoidextraktion aus dem Serum geeignet sind, Petroläther also am wenigsten, wird gegen Zaks Schlußfolgerungen nachdenklich stimmen. Über die Art, wie die Hirnphosphatide Zaks im Plasma wirken, herrscht noch Dunkel. Pekelharing (s. o.) glaubt, daß sie gerinnungshemmende Substanzen neutralisieren. Durch Serumlipoide und auch durch deren phosphatidhaltige Fraktionen konnte ich jedenfalls eine Neutralisation solcher „hypothetischer Stoffe", wie Bordet und Delange[2]) Pekelharing gegenüber sagen, nicht erzielen.

Mit alledem ist nichts gegen die Tatsache gesagt, daß den Lipoiden bei der Blutgerinnung eine wichtige Rolle zukommt. Dazu sind die Beobachtungen namhafter Forscher zu zahlreich, und auch meine Versuche sprechen in diesem Sinne. Doch ist es sicher empfehlenswert, bei dem heutigen Stand unseres noch lückenhaften Wissens auf diesem Gebiete, eine genaue Präzisierung der Rolle, welche die Lipoide im Gerinnungsprozeß spielen, noch nicht vorzunehmen. Eine Identifizierung mit der Thrombokinase ist sicher nicht angängig. In dieser Frage dürfte wohl der Standpunkt Rumpfs, den mit gewissen Einschränkungen ja auch Bordet und Delange[2]) in ihrer letzten Arbeit anerkannt haben, der richtige sein, daß gewisse Phosphatide zwar thromboplastische (im Sinne von Nolf), jedoch nicht thrombokinetische Wirkung haben.

Zum Schlusse sei die Bemerkung gestattet, daß in der vorstehenden Form diese Untersuchungen bereits 1914 fertiggestellt waren. Die Zeitverhältnisse zwangen mich damals dazu, dieselben abzubrechen, obwohl gerade die Versuche über die einzelnen Fraktionen der Serumlipoide wohl noch einen weiteren Ausbau erheischt hätten. Dieselben Umstände haben auch die Veröffentlichung der Arbeit bis jetzt verzögert.

Endlich erfülle ich noch die angenehme Pflicht, Herrn Dr. Hueck für die Anregung zu der Arbeit, sowie Herrn Prof.

[1]) l. c.
[2]) Berl. klin. Wochenschr. 51. Jg., Nr. 11, **1914**, 497ff.

Dr. Borst für die Überlassung der Mittel seines Institutes und die Übernahme des Referates bestens zu danken.

C. Ergebnisse.

I. Die Lipoide müssen eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung spielen, denn

a) mit Lipoiden reagierende Stoffe (Saponin, ölsaures Natron, Aceton) offenbaren im Reagensglase eine deutlich gerinnungshemmende Fähigkeit (Literatur und eigene Versuche);

b) mit Aether sulfuricus oder Petroläther extrahiertes Plasma zeigt im Reagensglase starke Gerinnungsverzögerung oder -unfähigkeit (Literatur und eigene Versuche);

c) mit reinem Schwefeläther (Narkoseäther) oder Petroläther extrahiertes Serum vermag im Reagensglase die Gerinnung von Blutplasma gar nicht mehr oder nur sehr verzögert zu erzeugen (eigene Versuche).

II. Es ist aber bis heute nicht angängig, diese noch dunkle Rolle der Lipoide bei der Blutgerinnung im einzelnen scharf zu umschreiben, sie etwa gar mit einer der bislang für die Gerinnung als wichtig erkannten Substanzen gleichzustellen (d. h. sie als Thrombokinase oder dergleichen zu bezeichnen), denn

a) es ist mir nicht gelungen, durch einfachen Zusatz der mit Äther aus Serum, Erythrocyten oder Gesamtblut extrahierten Lipoide oder deren Fraktionen, noch durch Cholesterin- oder Ovolecithinzusatz zu dem mit Äther oder Petroläther ausgeschüttelten Plasma oder Serum im Reagensglase die bei letzteren festgestellte Gerinnungsverzögerung oder -unfähigkeit wieder aufzuheben. Die Eigenwirkung dieser Lipoidzusätze war vielmehr meist eine leichte Hemmung;

b) die beschriebene Gerinnungsverzögerung durch Zusatz des mit Schwefeläther ausgeschüttelten Serums fand sich nur dann, wenn nach dem Schütteln feinste Trübungen in dem Serum auftraten. Gelang es, diese Trübungen zu vermeiden, so trat nicht eine Verzögerung, sondern Beschleunigung der Gerinnung auf.

III. Diese Beobachtungen fielen bei allen untersuchten Blutarten (Kaninchen-, Kälber-, Ochsen-, Schweine-, Pferde-, Hunde-, Hammelblut) und Plasmata (NaF-, Hirudin-, $MgSO_4$- und Oxalat-Plasma) gleichsinnig aus.

Über osmotische und kolloidale Eigenschaften des Muskels.

Von

Hans Winterstein.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Rostock.)

(Eingegangen am 18. März 1916.)

1. Einleitung.

J. Loeb hat als erster die Gewichtsveränderungen untersucht, die ausgeschnittene Muskeln in Lösungen von verschiedener Beschaffenheit erfahren. Seitdem sind derartige Versuche vielfach wiederholt worden und gehören insbesondere seit Overtons Arbeiten zu den Grundversuchen der physikalisch-chemischen Biologie. Ihre Bedeutung liegt auf der Hand. Eine Reihe von Problemen der allgemeinen wie der speziellen Physiologie sind aufs engste verknüpft mit dem Studium der Wasserverschiebungen, die die einzelnen Organe unter verschiedenen Bedingungen erfahren. Gibt es doch kaum ein anderes Mittel, das in gleichem Maße geeignet wäre, uns über die Eigenschaften der Grenzflächen der Zellen aufzuklären, deren große Bedeutung für die allgemeinen Lebenserscheinungen, für die Erregungs- und Stoffwechselvorgänge, die neueren physikalisch-chemischen und physiologischen Forschungen uns in immer wachsendem Maße kennen lehren. Hierzu kommt noch, daß eine Anzahl von speziellen Problemen, so beim Muskel jene der Contraction und Starre, gleichfalls Beziehungen zu diesen Erscheinungen aufweisen und daher durch ihr Studium weitere Klärung erfahren dürften.

Die am einfachsten durch Wägung oder Volummessung festgestellten Änderungen des Wassergehaltes von Organen können

nun aber zweifacher Art sein, osmotischer und kolloidaler. Osmotische Gewichtsänderungen kommen zustande, wenn infolge einer besonderen Beschaffenheit oder „elektiven Permeabilität“ der Zellgrenzflächen („Membranen“) osmotische Druckdifferenzen zwischen dem Zellinneren und der umgebenden Lösung nur unter Verschiebung von Wasser ausgeglichen werden können, weil das Wasser entweder ausschließlich („Semipermeabilität“) oder wenigstens leichter und rascher hindurchzutreten vermag als die gelösten Bestandteile. Gewichtsänderungen kolloidaler Natur werden auftreten, wenn das Quellungsvermögen der Kolloide des Zellinneren durch die Bestandteile der umgebenden Lösung eine Änderung erfährt.

Über den Anteil, der diesen beiden ganz verschiedenen Faktoren an den beim Muskel zu beobachtenden Gewichtsänderungen zukommt, gehen die Ansichten weit auseinander. Unter dem Einfluß der klassischen Osmoseversuche von Pfeffer, de Vries und Hamburger war man früher geneigt, auch beim Muskel hauptsächlich nach osmotischen Kräften zu suchen, während die Entwicklung der Kolloidchemie und die Erkenntnis ihrer Bedeutung für biologische Vorgänge neuerdings mehr die Tendenz stärkte, kolloidale Prozesse als ausschlaggebend anzusehen. Diese Abhängigkeit der Deutung der Versuche von der vorherrschenden Forschungsrichtung beweist aufs klarste ihre Unsicherheit und ihren überwiegend hypothetischen Charakter.

In der Tat gestattet die Feststellung der Gewichtsänderungen eines Organs im allgemeinen keine einwandfreie Schlußfolgerung auf die sie verursachenden Momente. Am ehesten wird man noch aus der Beobachtung, daß isosmotische Lösungen die gleichen Gewichtsänderungen (bzw. das Ausbleiben solcher) bewirken, den Schluß ziehen dürfen, daß lediglich osmotische Kräfte in Frage kommen. Denn es hat offenbar wenig Wahrscheinlichkeit für sich, daß das Quellungsvermögen genau in gleichem Maße beeinflußt werde wie der osmotische Druck; völlig ausschließen ließe sich freilich auch diese Möglichkeit nicht. Finden wir aber umgekehrt, daß isotonische Lösungen verschiedene Gewichtsänderungen erzeugen, so kann uns die Ursache dieses Verhaltens ganz unklar bleiben, da sowohl Änderungen des osmotischen Druckes im Zellinneren, wie solche der Permeabilität, wie schließlich solche des Quellungsvermögens

die gleichen Effekte herbeizuführen vermögen. Es ist also nicht verwunderlich, daß gleiche oder ähnliche Erscheinungen von verschiedenen Autoren in ganz verschiedenem Sinne gedeutet wurden.

J. Loeb[1]) beobachtete, daß Froschmuskeln in 0,7 $^0/_0$ iger NaCl-Lösung und damit isotonischen Salzlösungen ihr Gewicht zunächst nicht verändern, daß aber nach längerem Verweilen in isotonischen, ja sogar in stark hypertonischen Lösungen eine Gewichtszunahme eintritt. Er fand ferner, daß der Zusatz von Säuren (und Laugen) zur physiologischen Kochsalzlösung gleichfalls eine Gewichtszunahme bedingt, die wenigstens bei den unorganischen Verbindungen eine Funktion der Wasserstoff-(bzw. Hydroxyl-) Ionenkonzentration zu sein schien. Alle diese Erscheinungen suchte er auf rein osmotischem Wege zu erklären durch die Annahme, daß die in das Innere eindringende oder allmählich im Muskel selbst sich bildende Säure durch Aufspaltung von Verbindungen eine Erhöhung des osmotischen Druckes im Zellinneren herbeiführe. Aber später wies Loeb[2]) selbst auf Analogien zwischen diesen Gewichtsänderungen und der Flüssigkeitsresorption von Seifen hin und war geneigt, die Wasseraufnahme zum Teil auch auf ein verschiedenes Lösungsvermögen der durch das Eindringen der Salze im Muskel sich bildenden (Eiweiß-?) Verbindungen, also auf kolloidale Eigenschaften zu beziehen.

Overton[3]) beobachtete bei seinen Versuchen, daß die Wasseraufnahme von Froschsartorien in hypotonischen Salzlösungen beträchtlich hinter dem Werte zurückbleibt, der sich auf Grund der Annahme berechnen würde, daß die Muskelfasern einfach von semipermeablen Membranen umhüllte Salzlösungen von der Konzentration der physiologischen Kochsalzlösung seien. Er erklärte diesen Widerspruch durch die Annahme, daß ein Teil des Wassergehaltes des Muskels von Quellungswasser dar-

---

[1]) J. Loeb, Physiologische Untersuchungen über Ionenwirkungen. I. Mitt. Arch. f. d. ges. Physiol. **69**, 1, 1898. — II. Mitt. ebenda **71**, 457, 1898.

[2]) J. Loeb, Über die Ähnlichkeit der Flüssigkeitsresorption in Muskeln und in Seifen. Arch. f. d. ges. Physiol. **75**, 303, 1899.

[3]) E. Overton, Beiträge zur allgemeinen Muskel- und Nervenphysiologie. I. Arch. f. d. ges. Physiol. **92**, 115, 1902.

gestellt werde, und glaubte sogar den prozentischen Anteil desselben berechnen zu können. Es liegt aber auf der Hand, daß dies nur dann möglich wäre, wenn die unbewiesene Voraussetzung einer völligen und dauernden Semipermeabilität zutrifft.

Gerade durch die umgekehrte Annahme einer Änderung der letzteren hat Fletcher[1]) eine sehr einfache Erklärung für eine Reihe von ihm beobachteter Erscheinungen gegeben. Fletcher fand, daß der Muskel in hypotonischer Lösung nicht einfach Wasser aufnimmt, sondern daß auf die anfängliche Gewichtszunahme nach einer Reihe von Stunden wieder eine Abnahme folgt, und daß diese Wasserverschiebung für den frischen und für den ermüdeten Muskel einen verschiedenen und charakteristischen Verlauf aufweist. Er erklärte die spätere Gewichtsabnahme, ebenso wie das von Overton beobachtete Zurückbleiben der aufgenommenen Wassermenge hinter der theoretisch berechneten durch die Hypothese, daß durch die Wasseraufnahme die Semipermeabilität der Zellmembran leidet, daß diese gewissermaßen „löcherig" wird, so daß ein Herausdiffundieren gelöster Bestandteile aus dem Zellinneren erfolgen kann. Auch alle Arten von Starre würden die Semipermeabilität des Muskels mehr oder weniger vollständig beseitigen, weshalb die Gewichtsänderungen in hypotonischen Lösungen bei starren Muskeln nur geringfügig sind oder auch ganz fehlen.

Einen ganz extremen Standpunkt hat bekanntlich M. H. Fischer[2]) eingenommen: Auf Grund gewisser Analogien zwischen der Wasseraufnahme von Geweben und der Quellung von Gelatine und Fibrin in sauren Lösungen wollte er osmotischen Prozessen so gut wie jede größere Bedeutung absprechen und alle bisher an tierischen und pflanzlichen Geweben beobachteten Wasserverschiebungen (einschließlich der plasmolytischen und hämolytischen Erscheinungen, sowie der verschiedenen Arten pathologischer Ödeme) rein kolloidchemisch auf Quellungs- und Entquellungsvorgänge zurückführen. Die in den Geweben stattfindende Säurebildung würde das Quellungsvermögen der Zell-

---

[1]) W. M. Fletcher, The osmotic properties of muscle, and their modifications in fatigue and rigor. Journ. of Physiol. 30, 414, 1904.

[2]) M. H. Fischer, Über die Analogie zwischen der Wasserabsorption durch Fibrin und durch Muskel. Arch. f. d. ges. Physiol. 124, 69, 1908. — Das Ödem. Deutsch von Schorr und Ostwald. Dresden 1910.

kolloide erhöhen, während die Salze wiederum eine hemmende Wirkung ausüben. Die Konzentration der physiologischen Lösungen würde jene sein, in der die Säurequellung eben gerade aufgehoben wird. Das Unhaltbare der Fischerschen Anschauungen ist schon mehrfach betont worden. Beutner[1]), der auf verschiedenen Wegen eine Unterscheidung von osmotischer und kolloidaler Wasseraufnahme durchzuführen suchte, wies unter anderem darauf hin, daß auf 47° erhitzte Muskeln keine Gewichtsänderungen in anisotonischen Lösungen mehr zeigen, wohl aber noch eine Säurequellung und eine Entquellung bei Zusatz von Salz zu der Säure; ferner erwähnte er, daß am frischen Muskel auch Zucker eine Verminderung der Säureschwellung herbeiführe, was wohl nur durch osmotische Wirkung erklärbar sei. Auch Höber[2]) hat hervorgehoben, daß die Zucker, die keinen oder doch nur einen geringen Einfluß auf kolloidale Quellungsvorgänge ausüben, gleichwohl in isosmotischer Konzentration das Gewicht des Muskels ebenso unverändert lassen wie physiologische Salzlösungen.

Fischer hat aber überhaupt nicht den geringsten Versuch gemacht, den etwaigen Anteil osmotischer Prozesse bei seinen Quellungsversuchen zu ermitteln. Er tauchte alle Gewebe in stark hypotonische Salzsäurelösungen, die unter allen Umständen eine bedeutende Wasseraufnahme bewirken und ebenso selbstverständlich durch jeden Salzzusatz, mit dem ja auch eine Erhöhung des osmotischen Druckes verbunden war, eine Verminderung ihrer Schwellkraft erfahren mußten. Er vernachlässigte vollkommen die auf die anfängliche Gewichtszunahme stets nachfolgende „Entquellung", obwohl diese doch einen durchgreifenden Unterschied gegenüber dem Verhalten einfacher Kolloide darstellt, deren Quellung sich asymptotisch einem Maximum zu nähern pflegt. Am ehesten ließe sich noch die Ungleichheit in der quellungshemmenden Wirkung der verschiedenen Ionen zugunsten kolloidaler Vorgänge deuten. Aber

---

[1]) R. Beutner, Unterscheidung kolloidaler und osmotischer Schwellung beim Muskel. Diese Zeitschr. 39, 280, 1912. — Einige weitere Versuche betreffend osmotische und kolloidale Quellung des Muskels. Ebenda 48, 217, 1913.

[2]) R. Höber, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. 4. Aufl., Leipzig 1914, S. 386.

ganz abgesehen davon, daß auch Änderungen des osmotischen Druckes und der Permeabilität zum Teil mit gleichem Recht zur Erklärung herangezogen werden könnten, hat Fischer äquimolekulare Salzmengen zugesetzt, ohne zu berücksichtigen, daß äquimolekulare Salzmengen verschiedenwertiger Ionen nicht isotonisch sind. Dieser Umstand allein kann bereits in vielen Fällen die angeblich stärkere „Quellungshemmung" der Salze zwei- und dreiwertiger Kationen und Anionen erklären, da diese in äquimolekularer Konzentration einen viel höheren osmotischen Druck ausüben als die einwertigen.

So würde, um dies an einem Beispiel zu erläutern, $MgCl_2$ in äquimolekularer Konzentration nach Fischer beim Muskel (und anderen Organen) die Säurequellung viel stärker hemmen als NaCl. Ich konnte diese Angabe bestätigen: Zwei Gastrocnemien eines Frosches wurden in Lösungen von $^n/_{200}$-HCl gebracht, von denen die eine 0,7 % NaCl, die andere die damit äquimolekulare Menge, nämlich 2,4 % $MgCl_2$ enthielt. In $3\,^1/_2$ Stunden hatte das Gewicht des ersten Gastrocnemius um 13,2 % zugenommen, das des zweiten eine geringfügige Abnahme erfahren. Nun aber wurde der gleiche Versuch statt mit 2,4 %iger, mit 1,8 %iger $MgCl_2$-Lösung angestellt, die mit einer 0,7 %igen NaCl-Lösung ungefähr isotonisch ist. Und jetzt ergab sich gerade das umgekehrte Resultat: In einem Versuch nahm in etwa $5\,^1/_2$ Stunden das Gewicht des NaCl-Muskels um 12,7 %, das des $MgCl_2$-Muskels um 28,7 % zu, in einem zweiten Versuche das des NaCl-Muskels um 15,1 % und das des $MgCl_2$-Muskels um 33,6 %. Die angebliche „entquellende" Wirkung des Mg war also einfach durch den höheren osmotischen Druck der angewandten Konzentration bedingt, und sein Einfluß auf die Wasseraufnahme in sauren Lösungen ist, aus nicht näher untersuchten Gründen, gerade entgegengesetzt dem von Fischer angegebenen. Dieses Beispiel illustriert wohl zur Genüge die Wertlosigkeit der Fischerschen Angaben, infolge der Vernachlässigung der osmotischen Verhältnisse.

Von Fürth und Lenk[1]) sind in den gleichen Fehler verfallen: Sie untersuchten die Gewichtsänderungen von Muskeln

[1]) O. v. Fürth und E. Lenk, Die Bedeutung von Quellungs- und Entquellungsvorgängen für den Eintritt und die Lösung der Totenstarre. Diese Zeitschr. 33, 341, 1911.

in Milchsäurelösungen und fanden, daß auf die anfängliche Zunahme später eine Abnahme folgt, die nicht eine direkte Wirkung einer etwaigen Steigerung der Säurekonzentration durch die vom Muskel selbst gebildete Säure sein konnte. Da sie nun weiter beobachteten, daß Muskeln nach Lösung der Totenstarre, sowie bei künstlich durch Wärme oder chemische Einwirkungen hervorgerufener Starre ein geringeres Wasseraufnahmevermögen zeigen, so stellten sie die Theorie auf, daß die Totenstarre des Muskels auf einer durch Säureansammlung bedingten Quellung, die Lösung der Starre dagegen auf einer Entquellung infolge von Gerinnung des Muskeleiweißes bei höherer Säurekonzentration beruhe. Auch hier ist die Möglichkeit einer Beteiligung osmotischer Vorgänge, die diesen Schlußfolgerungen natürlich ihre Grundlage rauben würde, völlig außer acht gelassen.

2. Die Wirkung anisotonischer Lösungen.

Die vorangehenden Darlegungen dürften zur Genüge dargetan haben, wie durchaus unsicher bisher viele unserer Kenntnisse über die osmotischen und kolloidalen Eigenschaften des Muskels sind, und wie notwendig es wäre, über Mittel zu verfügen, die eine einwandfreie Scheidung dieser beiden Kategorien von Erscheinungen gestatten. Ich habe nun gefunden, daß relativ sehr einfache Methoden genügen, um die durch Änderungen des Quellungsvermögens, des osmotischen Druckes und der Permeabilität bedingten Wasserverschiebungen voneinander zu sondern[1]).

Was zunächst die Sonderung der durch osmotische und der durch kolloidale Kräfte bedingten Änderungen des Wassergehaltes anlangt, so gründet sie sich auf die einfache Überlegung, daß die ersteren eine besondere Beschaffenheit der Zellgrenzflächen (eine „elektive Permeabilität der Zellmembran") zur Voraussetzung haben und daher bei Zerstörung der normalen Zellstruktur in Fortfall kommen müssen. Vereinzelte Versuche in dieser Richtung sind bereits früher unternommen worden. So beobachtete, wie schon erwähnt, Beutner (l. c.) den Fortfall der in anisotonischen Lösungen zu beobachtenden Gewichts-

[1]) Kurz mitgeteilt in: Die Untersuchung der osmotischen und kolloidalen Eigenschaften der Gewebe. Wiener med. Wochenschr. 1916, S. 551.

änderungen des Muskels bei Erhitzen auf 47°. Siebeck[1]) sah die sonst festgestellte Gewichtszunahme der Froschniere in verdünnter Ringerlösung sowie in isotonischer KCl-Lösung nach vorangegangenem Gefrieren- und Wiederauftauenlassen ausbleiben. Eine systematische Verwertung dieses Prinzips ist bisher nicht erfolgt.

Als einfachstes und sicherstes Mittel zur Zerstörung der Zellstruktur erschien mir die Zerkleinerung des Gewebes. Es wurde das folgende Verfahren eingeschlagen: Die Beinmuskulatur von Fröschen wurde mit der Schere in kleine Stücke zerschnitten und diese mit Seesand und etwas physiologischer Kochsalzlösung zu einem Brei zerrieben. Durch mehrfaches Nachfüllen von Kochsalzlösung und Abgießen wurde dieser möglichst vom Sande befreit und in Gazesäckchen gefüllt, die nun in die verschiedenen Lösungen getaucht wurden. Es ergab sich, daß auf diese Weise in der Tat die normalen osmotischen Eigenschaften des Muskels beseitigt werden, und die am intakten Muskel in anisotonischen NaCl-Lösungen zu beobachtenden Gewichtsänderungen gänzlich in Fortfall kommen. Es läßt sich geradezu verfolgen, wie mit fortschreitender Zerkleinerung die osmotischen Wasserverschiebungen immer geringer werden, um schließlich völlig zu verschwinden. Einige Versuchsprotokolle mögen das Gesagte erläutern:

Die Wägungen sind begreiflicherweise nicht sehr genau, weil die Menge des von den Gazesäckchen festgehaltenen Wassers immer etwas variieren wird; doch gelingt es bei einiger Übung, die Differenzen der Wägung auf etwa 0,1 g bei einem Gesamtgewicht von 5 bis 10 g, d. i. also auf etwa 1 bis 2 $^0/_0$ herunterzudrücken. Da Muskeln und Muskelbrei mitunter in physiologischer NaCl-Lösung zunächst etwas an Gewicht zunehmen, muß man, um die eintretenden Gewichtsänderungen mit Sicherheit auf die Anisotonie der Lösung beziehen zu können, die Muskelsäckchen zweckmäßig erst einige Zeit in 0,7 $^0/_0$ iger NaCl-Lösung liegen lassen. Um genau vergleichbare Bedingungen zu erhalten, wurden auch die zur Kontrolle dienenden (demselben Frosche entnommenen) intakten Muskeln in ein Gazesäckchen eingeschlossen.

Wie folgende Beispiele zeigen, bewirkt bereits das feine Zerschneiden eine hochgradige Herabsetzung und das Zerreiben ein völliges Verschwinden der normalen Gewichtsänderungen,

[1]) R. Siebeck, Über die „osmotischen Eigenschaften" der Nieren. Arch. f. d. ges. Physiol. 148, 443, 1912.

Versuch vom 23. X. 15.

Gewicht in:	Intakte Muskeln	Fein zerschnittene Muskeln (nicht zerrieben!)
0,7 % NaCl	6,55 g	5,50 g
Aqua dest. (nach 1 Std.)	7,40 g (+ 13 %)	5,90 g (+ 7,3 %)
5 % NaCl (nach 1 Std.)	6,70 g (– 9,5 %)	5,70 g (– 3,4 %)

Versuch vom 28. X. 15.

Gewicht in:	Intakte Muskeln	Fein zerschnittene Muskeln (nicht zerrieben!)
0,7 % NaCl	4,35 g	4,85 g
3 % NaCl (nach 1¼ Std.)	3,70 g (– 14,9 %)	4,75 g (– 2,1 %)
Aqua dest. (nach 1 Std.)	4,60 g (+ 24,3 %)	5,00 g (+ 5,3 %)

Versuch vom 25. X. 15.

Gewicht in:	Intakte Muskeln	Muskelbrei
0,7 % NaCl	5,4 g	8,1 g
Aqua dest. (nach 110 Min.)	6,3 g (+ 16,7 %)	8,0 g (– 1,2 %)
5 % NaCl (nach 60 Min.)	5,5 g (– 12,7 %)	8,9 g (+ 11,3 %)

die daher zweifellos osmotischer und nicht kolloidaler Natur sind. Selbst in destilliertem Wasser zeigt der Muskelbrei niemals eine deutliche Gewichtszunahme, und in stark hypertonischen Lösungen tritt keine Gewichtsabnahme, sondern, wie der angeführte Versuch zeigt und noch mehrfach beobachtet wurde, merkwürdigerweise sogar eine Gewichtszunahme ein. Besonders deutlich ist diese in hypertonischer $MgCl_2$-Lösung. So wurde in zwei Versuchen mit 9 % (d. i. der fünffachen Konzentration einer mit physiologischer NaCl-Lösung isotonischen) $MgCl_2$-Lösung bei einem Anfangsgewicht des Muskelbreies von 7,45 und 8,35 g in 5½ bzw. 4¾ Stunden eine Gewichtszunahme von 1,1 g (= 14,8 %), bzw. 1,15 g (= 13,8 %) festgestellt. Die Ursache dieser Erscheinung, die vermutlich mit der schon von Loeb nach längerem Verweilen in Salzlösungen auch an intakten Muskeln beobachteten Gewichtszunahme identisch ist und jedenfalls nicht auf osmotischen Vorgängen beruht, wurde nicht weiter verfolgt.

8. Die Wirkung von Säuren.

Gehen wir nunmehr über zur Untersuchung der Säurewirkung nach Ausschaltung der osmotischen Faktoren. Fischer

verfuhr, wie schon erwähnt, einfach in der Weise, daß er die Froschgastrocnemien in verdünnte Salzsäure tauchte. Stellt man die gleichen Versuche mit Muskelbrei an, so beobachtet man gleichfalls eine Gewichtszunahme, die jedoch von ganz anderer Größenordnung ist als bei intakten Muskeln, wie das folgende Beispiel zeigt, in welchem die Wasseraufnahme der Gastrocnemien und des aus der Oberschenkelmuskulatur desselben Frosches bereiteten Muskelbreies miteinander verglichen wurde:

Versuch vom 6. XII. 15.

(Wägung des Muskelbreies auf etwa 0,1 g, des Gastrocnemius auf etwa 0,01 g genau.)

Gewicht in:	Gastrocnemius	Muskelbrei	Gewicht in:	Gastrocnemius	Muskelbrei
0,7 % NaCl . .	0,550 g	6,50 g	0,7 % NaCl . .	0,565 g	5,95 g
Aqua dest. . . (nach 7 Std.)	0,940 g	6,55 g	$^n/_{100}$-HCl . . . (nach 7 Std.)	0,925 g	6,35 g
Gew.-Zunahme	71 %	in der Fehlergrenze	Gew.-Zunahme	63,7 %	6,7 %

Während der intakte Gastrocnemius in $^n/_{100}$-HCl fast 64 % an Gewicht zunahm, betrug die Wasseraufnahme des Muskelbreies unter den gleichen Bedingungen nur etwa $^1/_{10}$ dieses Wertes. In destilliertem Wasser blieb das Gewicht des Muskelbreies unverändert, während das Gewicht des Gastrocnemius um 71 % anstieg, also um einen höheren Betrag als in $^n/_{100}$-HCl. Schon diese letztere Beobachtung zeigt klar, daß auch die Wasseraufnahme in Säurelösungen beim intakten Muskel zu bei weitem größten Teile osmotischer Natur war, bedingt durch die starke Hypotonie der Lösung. Der quellende Einfluß der Säure, der beim Muskelbrei rein zutage tritt, war in diesen Versuchen nicht einmal stark genug, um den Einfluß der durch die Säure bedingten Steigerung des osmotischen Druckes auszugleichen. Die Gewichtsänderung des intakten Muskels in einer Säurelösung stellt mithin die Resultante zweier Faktoren dar, eines kolloidalen **und** eines osmotischen.

Diese Tatsache erklärt eine weitere von Fischer beobachtete und falsch gedeutete Erscheinung. Fischer fand, daß die „Quellung" des Muskels bei Zunahme der Säurekonzentration bis zu einem gewissen Grade ansteigt, bei weiterer Steigerung

derselben aber wieder geringer wird. Aus seinen Tabellen ergibt sich, daß das Maximum des Quellungsgrades bereits bei einer Konzentration von etwa $^n/_{200}$-HCl erreicht wird, und daß in $^n/_{100}$-HCl der Quellungsgrad schon deutlich niedriger ist. Verwendet man aber Muskelbrei, so findet man, daß noch in $^n/_{20}$-HCl eine vielfach stärkere Quellung eintritt als in $^n/_{200}$-HCl, und daß erst in $^n/_{10}$-HCl eine deutliche Verminderung des Quellungsvermögens erfolgt, die maximal quellende Konzentration also viel höher liegt, als Fischer angibt. Beim intakten Muskel wird eben der Einfluß der durch Erhöhung der Säurekonzentration bewirkten Steigerung der Quellungskraft bei weitem übertroffen durch die Verminderung der osmotischen Druckdifferenz, die mit dieser Erhöhung einhergeht.

Aus dem Nachweis, daß bei der Säureschwellung des intakten Muskels auch osmotische Prozesse eine Rolle spielen, ergibt sich die von Fischer beobachtete Tatsache, daß jeder Salzzusatz zu der Säurelösung eine Verminderung der Wasseraufnahme herbeiführt, als eine selbstverständliche Notwendigkeit. Es fragt sich aber, ob diese Verminderung ausschließlich osmotischer und nicht vielleicht auch kolloidaler Natur ist. Zugunsten der letzteren Annahme spricht von vornherein die Beobachtung von Fischer, daß auch unorganisierte Kolloide, wie Gelatine oder Fibrin, durch Salze eine Quellungshemmung erfahren.

Zur Entscheidung dieser Frage wurden wieder Versuche mit Muskelbrei angestellt, die in der Tat ergaben, daß auch hier die quellungshemmende Wirkung der Salze feststellbar ist. Während der Muskelbrei, wie erwähnt, in $^n/_{200}$-HCl meist eine leichte Quellung von einigen Prozent aufweist, bleibt diese vollständig aus, wenn die Säurelösung 0,7 $^0/_0$ oder auch nur die halbe Konzentration NaCl enthält. — Die entquellende Wirkung der Salze ist auch bei höheren Säurekonzentrationen sehr deutlich, wenn sie hier auch nur in einer Verminderung und nicht in einer völligen Aufhebung der Quellung zum Ausdruck kommt. Der Unterschied gegenüber osmotischen Einflüssen tritt hier auch darin zutage, daß diese Quellungshemmung charakteristisch für Salze ist. Während nach Beutner (vgl. S. 52) am intakten Muskel auch Zucker eine Verminderung der Säureschwellung herbeiführt, ist dieser nach Ausschaltung der osmo-

tischen Faktoren ohne deutliche Wirkung, wie der folgende an dem Brei wärmestarrer Muskeln angestellte Versuch zeigt, in welchem die Gewichtszunahme in reiner $^{n}/_{20}$-HCl und in $^{n}/_{20}$-HCl mit Zusatz von 0,7 $^{0}/_{0}$ NaCl, bzw. der isotonischen Menge Rohrzucker verglichen wurde:

Gewicht	$^{n}/_{20}$-HCl	$^{n}/_{20}$-HCl + NaCl	$^{n}/_{20}$-HCl + Rohrzucker
Zu Beginn . .	5,23 g	5,78 g	6,33 g
Nach 5 Std. . .	7,10 g (+ 35,8 $^{0}/_{0}$)	6,55 g (+ 13,3 $^{0}/_{0}$)	8,05 g (+ 27,2 $^{0}/_{0}$)
„ 24 „ . .	7,61 g (+ 45,5 $^{0}/_{0}$)	6,77 g (+ 17,1 $^{0}/_{0}$)	9,97 g (+ 57,5 $^{0}/_{0}$)

nach 24 Stunden war annnähernd Gewichtskonstanz erreicht.

Die Angaben Fischers, daß Salze eine quellungshemmende Wirkung ausüben, ist mithin zutreffend, doch ist es am intakten Muskel wegen des Eingreifens osmotischer Kräfte völlig unmöglich, den Grad dieser Hemmung festzustellen.

Noch eine Erscheinung bedarf der Aufklärung: Es wurde früher erwähnt (S. 53), daß intakte Muskeln in $^{n}/_{200}$-HCl, die 0,7 $^{0}/_{0}$ NaCl enthält, eine deutliche Gewichtszunahme zeigen; beim Muskelbrei hingegen wird die Quellung in dieser Säure durch die gleiche NaCl-Konzentration völlig gehemmt. Diese Beobachtung läßt, wie mir scheint, nur zwei Erklärungen zu: Entweder die Muskelsalze üben keine so stark quellungshemmende Wirkung aus wie die physiologische Kochsalzlösung, die in unversehrte Zellen nicht einzudringen vermag, oder aber es greifen auch hierbei noch osmotische Prozesse ein, indem vielleicht entsprechend der von Loeb geäußerten Vorstellung (vgl. S. 50) die eindringende Säure eine Spaltung von Verbindungen und so eine Erhöhung des osmotischen Druckes im Zellinneren herbeiführt.

4. Die „Entquellung“.

Fischer sah, wie schon erwähnt, auf die „Säurequellung“ eine „Entquellung“ folgen, und v. Fürth und Lenk (l. c.) machten diese von ihnen bestätigte Beobachtung zum Ausgangspunkt weiterer Studien. Da sie das Wasserbindungsvermögen der Muskeln nach spontaner oder künstlich herbeigeführter Gerinnung vermindert fanden, so schlossen sie daraus, daß die „Entquellung“ auf einer Gerinnung der Muskelsubstanz beruhe, und gründeten darauf ihre eingangs zitierte Theorie der Entstehung und Lösung der Totenstarre (vgl. S. 54). Handelt es

sich bei diesen Beobachtungen nun wirklich um kolloidale Vorgänge, oder spielen auch hier wieder osmotische Prozesse eine Rolle?

Untersuchungen an Muskelbrei mußten auch hier die Entscheidung bringen. Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß der in der üblichen Weise hergestellte Brei auf zwei oder mehr Gazesäckchen verteilt und nun der Verlauf der Quellung in Säurelösungen teils an unveränderten, teils an solchen Portionen untersucht wurde, die durch einige Minuten einer Temperatur von 60 bis 100° ausgesetzt worden waren. Die Resultate mögen an der Hand einer Reihe von Versuchsprotokollen abgeleitet werden.

Versuch vom 2. I. 16

Quellung in n/20-HCl.

Gewicht	Frisch	Wärmestarr (65°)
Zu Beginn	6,21 g	5,51 g
Nach 1 Stunde . . .	6,64 g (+ 6,9%)	6,54 g (+ 18,7%)
„ 7½ Stunden .	7,04 g (+ 13,4%)	8,01 g (+ 45,4%)
„ 25 „ .	Substanzverlust durch	9,01 g (+ 63,5%)
„ 46½ „ .	Auflösung	9,19 g (+ 66,8%)

Versuch vom 4. I. 16.

Quellung in n/20-HCl mit 0,7% NaCl-Gehalt.

Gewicht	Frisch	Wärmestarr (50 bis 60°)
Zu Beginn	7,94 g	7,67 g
Nach 15 Stunden .	9,42 g (+ 18,6%)	8,99 g (+ 17,3%)
„ 24 „ .	9,57 g (+ 20,5%)	9,16 g (+ 19,4%)
„ 38½ „ .	9,75 g (+ 22,8%)	9,24 g (+ 20,5%)
„ 62½ „ .	9,91 g (+ 24,8%)	9,37 g (+ 22,2%)
„ 118 „ .	9,95 g (+ 25,3%)	9,41 g (+ 22,7%)

Versuch vom 6. I. 16.

Vergleich der Quellung frischen und bei 60° koagulierten Muskelbreies in n/20-HCl mit und ohne 0,7% NaCl-Gehalt.

	n/20-HCl + NaCl		n/20-HCl	
Gewicht	frisch	koaguliert	frisch	Koaguliert
Beginn . .	5,69 g	4,92 g	6,90 g	5,09 g
Nach 6 Std.	6,63 g (+ 16,5%)	5,83 g (+ 18,5%)	8,55 g (+ 23,9%)	7,32 g (+ 43,8%)
„ 21 „	6,80 g (+ 19,5%)	6,06 g (+ 23,2%)	8,63 g (beginnende Auflösung)	7,84 g (+ 54,0%)
„ 47 „	6,92 g (+ 21,6%)	6,26 g (+ 27,2%)		8,15 g (+ 60,1%)

Der Versuch wird mit dem Muskelbrei des letzten Stabes fortgesetzt; nach weiteren 77 (insgesamt 124) Stunden ist mit ca. 8,6 g Gewichtskonstanz erreicht; nach weiteren 67 Stunden wird der Muskelbrei in $^n/_{10}$-HCl gebracht; in dieser stärkeren Konzentration tritt eine Gewichtsabnahme ein.

Versuch vom 9. I. 16.

Quellung in $^n/_{10}$-Milchsäure mit 0,7 % NaCl-Gehalt.

Gewicht	Frisch	Koaguliert (70°)
Beginn	6,84 g	7,06 g
Nach 3 ½ Std. . .	7,30 g (+ 6,7 %)	7,49 g (+ 6,1 %)
„ 29 „ . . .	7,74 g (+ 13,2 %)	8,27 g (+ 17,1 %)
„ 69 „ . . .	7,83 g (+ 14,5 %)	8,33 g (+ 18,0 %)
Fortsetzung des Quellungsversuches in $^n/_{10}$-Milchsäure ohne NaCl.		
Nach 7 Std.	8,50 g (+ 8,6 %)	9,58 g (+ 15,0 %)
„ 23 „	9,66 g (+ 23,4 %)	10,27 g (+ 23,3 %)
„ 32 „	9,88 g (beginnende Auflösung)	10,44 g (+ 25,3 %)

Der Versuch mit dem koagulierten Muskelbrei wird fortgesetzt; sein Gewicht steigt in erneuerter Lösung von $^n/_{10}$-Milchsäure weiter an, so daß die Gazehülle zu eng wird und durch eine neue ersetzt werden muß; in dieser erfolgt ein weiteres starkes Ansteigen des Gewichts, das auch nach Übertragung in destilliertes Wasser noch weitergeht, so daß 12 Tage nach Beginn des Versuches das Gewicht des stark verflüssigten Breies auf etwa das Dreifache des Anfangswertes gestiegen ist.

Auch in einem zweiten Versuche mit $^n/_{10}$-Milchsäure stieg das Gewicht des koagulierten Muskelbreies bis zu immer weitergehender Verflüssigung in 5 Tagen auf rund das Dreifache des Anfangswertes, während an frischem Muskelbrei wegen des bald einsetzenden Substanzverlustes durch Auflösung unter starker Trübung der umgebenden Flüssigkeit der Verlauf der Quellung nicht weiter verfolgbar ist.

Versuch vom 15. I. 16.

Vergleich der Quellung frischen und bei 100° koagulierten Muskelbreies in $^n/_{80}$-HCl und $^n/_{10}$-Milchsäure.

Gewicht	$^n/_{80}$ HCl		$^n/_{10}$-Milchsäure	
	frisch	koaguliert	frisch	koaguliert
Beginn	5,92 g	4,77 g	5,50 g	5,50 g
Nach 7 Std. . .	7,48 g (+ 26,4 %)	6,12 g (+ 28,3 %)	7,37 g (+ 34,0 %)	7,60 g (+ 38,2 %)

Versuch vom 27. I. 16.

Quellung in $^n/_{10}$-HCl.

Gewicht	Frisch	Koaguliert (70°)
Beginn	5,92 g	6,04 g
Nach 2½ Std. . .	7,78 g (+ 31,4%)	8,09 g (+ 33,9%)
„ 22½ „ . . .	8,06 g	8,16 g
„ 48 „ . . .	8,24 g	8,04 g
„ 94½ „ . . .	8,15 g	7,98 g

fortschreitend leichter Substanzverlust; in $^n/_{20}$-HCl gebracht steigt das Gewicht wieder innerhalb 25½ Stunden auf 8,67 bzw. 8,55 g (um 6,4 bzw. 7,1%); Zusatz von NaCl bewirkt starke Gewichtsabnahme.

Bei lange fortgesetzten Versuchen kann eine leichte, allmählich fortschreitende Gewichtsabnahme zur Beobachtung kommen, ohne daß immer ein direkter Substanzverlust durch Trübung der Lösung nachweisbar wäre. Sie beruht vielleicht auf autolytischen oder durch Mikroorganismen bedingten Spaltungsvorgängen und ist von ganz anderer Größenordnung als die von den verschiedenen Autoren beschriebene „Entquellung". So betrug z. B. in zwei an frischem und an wärmestarrem Muskelbrei angestellten Versuchen in $^n/_{10}$-Milchsäure mit Zusatz von 0,7% NaCl, nachdem am 2. Tage das Gewichtsmaximum von 12,12 bzw. 12,75 g (bei einem Anfangsgewicht von 9,90 bzw. 10,77 g) erreicht worden war, der Gewichtsverlust im Verlaufe der folgenden 9 Tage 0,6 bzw. 0,3 g.

Die Resultate der vorangehend mitgeteilten Versuche stehen in scharfem Gegensatze zu den am intakten Muskel gewonnenen Beobachtungen von Fischer und von v. Fürth und Lenk. An unverändertem Muskelbrei ist in reiner Säurelösung, besonders in der sehr stark quellend wirkenden $^n/_{10}$-Milchsäure der Verlauf der Quellung meist nur kurze Zeit verfolgbar, weil frühzeitig eine immer weiter fortschreitende Auflösung der Muskelsubstanz erfolgt, die unter starker Trübung der umgebenden Lösung die Gazehülle passiert. Bei Salzzusatz aber, sowie an durch Wärme koaguliertem Muskelbrei läßt sich der Verlauf der Quellung durch Tage verfolgen. Es zeigt sich, daß hier die Gewichtszunahme in einer Kurve von mitunter deutlich logarithmischem Charakter entweder bis zu einem Maximum ansteigt, das dann annähernd festgehalten wird, oder bis zu immer stärkerer Verflüssigung weitergeht. Eine Entquellung tritt nicht ein.

Die Muskelkolloide verhalten sich mithin genau so wie die unorganisierten Kolloide, Gelatine oder Fibrin, und die von

den Autoren als „Entquellung“ gedeutete Gewichtsabnahme bei intakten Muskeln ist gar nicht kolloidaler, sondern osmotischer Natur. Auf ihre Ursache kommen wir noch zurück.

Ebenso unrichtig ist die Annahme von v. Fürth und Lenk, daß das Quellungsvermögen der geronnenen Muskelsubstanz geringer sei als das der genuinen. Der durch Wärme koagulierte Muskelbrei zeigt in salzhaltigen Säurelösungen ungefähr das gleiche, in salzfreien Säuren sogar oft ein bedeutend stärkeres Wasserbindungsvermögen. Mit dieser Feststellung schwindet jede sichere Grundlage für die von den Autoren aufgestellte Theorie, nach der die Totenstarre auf einem Quellungs- und ihre Lösung auf einem durch die Muskeleiweißgerinnung bedingten Entquellungsvorgange beruhe. Ich stimme mit v. Fürth vollkommen überein, daß die Totenstarre durch die Ansammlung von Milchsäure bedingt wird und halte es auch für sehr wahrscheinlich, daß ihre Lösung mit der Gerinnung des Muskeleiweißes in Zusammenhang steht; inwieweit aber bei diesen Vorgängen Quellungs- und Entquellungsprozesse eine Rolle spielen, läßt sich zurzeit ebensowenig mit Bestimmtheit sagen wie für die analogen Erscheinungen der Muskelzusammenziehung und -erschlaffung.

5. Die Permeabilität.

Gestattet die Methode der Gewebszerkleinerung mithin in einfacher Weise eine Abtrennung der osmotischen von den kolloidalen Wasserverschiebungen, so fehlt uns zu einer restlosen Analyse noch ein Verfahren zur Sonderung der durch Änderungen des osmotischen Binnendruckes und der durch Änderung der Grenzflächenpermeabilität bedingten Erscheinungen. Gerade diese letzteren sind es ja, die aus den eingangs erwähnten Gründen allgemein-physiologischer Natur unser größtes Interesse beanspruchen.

Bekanntlich ist die Wägungsmethode — besonders wieder von Overton — auch zum Studium der Zellpermeabilität verwendet worden auf Grund der Überlegung, daß nur solche Substanzen ein osmotisches Druckgefälle und daher eine Wasserverschiebung werden erzeugen können, die in die Zellen nicht oder doch nur langsam eindringen. Auf diese Weise hat

Overton (l. c.) die Undurchgängigkeit der Zellmembran für die meisten Salze und Zucker und ihre Durchgängigkeit für die Narkotica dargetan. So zuverlässig aber auch die Deutung solcher Versuche in den extremen Fällen sein wird, in denen die zu untersuchende Substanz entweder so rasch eindringt, daß sie gar keine Wasserverschiebung veranlaßt, oder aber umgekehrt infolge ihres Nichteindringens osmotisch voll zur Wirkung kommt, so unsicher kann sie in den dazwischenliegenden Fällen werden, in denen eben außer teilweiser oder unvollkommener Durchgängigkeit auch Änderungen des osmotischen Innendruckes oder des Wasserbindungsvermögens mit zur Erklärung herangezogen werden können, wie wir dies schon für die einfache Wasseraufnahme aus einer hypotonischen Kochsalzlösung kennen gelernt haben.

Das Verfahren, dessen ich mich bedient habe, um die Permeabilität von Muskeln unabhängig von allen übrigen Faktoren zu untersuchen, beruht darauf, daß nicht, wie sonst üblich, die im Muskel selbst eintretende Wasserverschiebung zweifelhaften Ursprungs, sondern die durch Muskelmembranen hindurch erfolgende Wasserverschiebung durch Wägung ermittelt wird. Als vorzüglich geeignet für solche Diffusionsversuche erwiesen sich die überaus zarten seitlichen Bauchmuskeln weiblicher Wasserfrösche (die Muskulatur der Männchen ist viel dicker und daher weniger brauchbar). Aus diesen Muskeln werden kreisrunde Stücke herausgeschnitten und über die offenen Enden kleiner Glaszylinder von etwa 2 ccm Inhalt (ca. 12 mm Durchmesser und 20 mm Länge) gebunden, die mit einer Lösung von bekannter Zusammensetzung gefüllt werden. Auf diese Weise erhält man gewissermaßen künstliche, an zwei Stellen von Muskelmembranen begrenzte Zellen von genau bekanntem Zellinhalt, dessen Menge durch Wägung bestimmt wird, indem man von dem Gesamtgewicht der Zellen dasjenige der Glasröhrchen und der vor dem Aufbinden gewogenen Muskelmembranen abzieht. Diese Zellen werden nun für eine bestimmte Zeit in die auf ihre osmotische Wirksamkeit zu untersuchende Lösung getaucht und durch neuerliche Wägung der Gesamtzellen und der Muskelmembranen am Ende des Versuches die eingetretenen Gewichtsänderungen des Zellinhaltes bestimmt. Auf diese Weise wird direkt die durch die Membranen hindurchdiffun-

dierte Flüssigkeitsmenge gemessen, und so offenbar unabhängig von allen sonstigen Einflüssen die Permeabilität untersucht, welche die Muskelmembranen unter den gegebenen Bedingungen aufweisen.

Diese Methode hat aber noch einen anderen und, wie wir sehen werden, sehr bedeutungsvollen Vorteil. Bisher ist, soweit ich dies übersehe, stets nur die Permeabilität für die gelösten Bestandteile, aber nie die für Wasser berücksichtigt worden. Wenn wir aber finden, daß ein Organ unter bestimmten Bedingungen, z. B. ein Muskel nach Eintritt der Starre, aus der gleichen Lösung weniger Wasser aufnimmt, so könnte diese Erscheinung, sofern sie überhaupt durch eine Änderung der Permeabilität bedingt ist, ebensowohl auf einer Zunahme der Permeabilität für die gelösten Bestandteile, wie auf einer Abnahme der Permeabilität für Wasser beruhen. Diese letztere Möglichkeit scheint bisher kaum in Betracht gezogen worden zu sein [1]).

Das oben beschriebene Verfahren gestattet nun auch eine einwandfreie Untersuchung dieser Frage. Füllt man die künstliche Zelle mit der Lösung einer chemisch gut bestimmbaren Substanz, z. B. einfach mit physiologischer Kochsalzlösung, deren Salzgehalt durch Chlortitration leicht genau festgestellt werden kann, und titriert am Ende des Versuches den Salzgehalt des Zylinderinhaltes, so ergibt die eingetretene Änderung desselben die Größe der Salzdiffusion und damit der Salzpermeabilität, während die gleichzeitige Berücksichtigung der durch Wägung ermittelten Wasserverschiebung einen Schluß auf die Wasserpermeabilität zuläßt. Finden wir z. B., daß die

---

[1]) v. Fürth und Lenk (l. c. 347) geben allerdings an, Fletcher (l. c.) habe die von ihm beobachtete Verminderung der Wasseraufnahme starrer Muskeln aus hypotonischen (die Autoren schreiben „hypertonischen") Lösungen dahin gedeutet, daß „die den Muskel gegen das äußere Medium abgrenzende ‚Membran' ihre Durchlässigkeit für Wasser eingebüßt habe". Aber in Fletchers Arbeit sucht man vergeblich nach einer solchen Behauptung. Fletcher spricht vielmehr lediglich von einem Verlust der Semipermeabilität, die er aber nicht auf eine Undurchgängigkeit für Wasser, sondern, wie schon eingangs erwähnt (vgl. S. 51), gerade umgekehrt — und, wie wir sehen werden, tatsächlich zutreffend — auf eine Erhöhung der Durchlässigkeit für die gelösten Bestandteile, auf ein „Löcherigwerden" der Membran zurückführt.

künstliche Zelle unter bestimmten Bedingungen bei gleicher osmotischer Druckdifferenz aus einer hypotonischen Lösung weniger Wasser aufnimmt, und ergibt die Titration eine Zunahme der Salzdiffusion, die ausreicht, um die verminderte Wasseraufnahme zu erklären, so ist diese durch Erhöhung der Salzpermeabilität bedingt; ergibt die Titration des Zellinhaltes aber, daß die Salzdiffusion unverändert geblieben oder gar gleichfalls vermindert ist, so muß die Ursache der Erscheinung in einer Verminderung der Wasserpermeabilität gelegen sein.

Ändert sich die Permeabilität sowohl für Wasser wie für die gelösten Bestandteile, so wird, wenn auch der relative Anteil beider Durchgängigkeitsveränderungen nicht festgestellt werden kann, doch die auf Grund der Bestimmung der aufgenommenen Wassermenge und der abgegebenen Salzmenge leicht durchführbare Berechnung der Konzentration des Zylinderinhaltes am Schlusse des Versuches eine Beurteilung dieser Erscheinung ermöglichen. Denn bei gleicher Versuchsdauer wird unter sonst gleichen Bedingungen der Konzentrationsausgleich bei Verminderung der Permeabilität offenbar nur einen geringeren, bei Erhöhung derselben dagegen einen stärkeren Grad erreichen. Die Endkonzentration des Zylinderinhaltes am Schlusse des Versuches stellt mithin einen getreuen Maßstab der Allgemeinpermeabilität dar.

Diese Methode wurde in der Hauptsache dazu benutzt, den Einfluß der Narkose auf die Permeabilität zu studieren. Von den Resultaten dieser Untersuchungen, über die in einer gesonderten Mitteilung berichtet werden soll, sei hier nur das eine hervorgehoben, daß in der Tat auch die Permeabilität für Wasser veränderlich und mindestens ebenso großen Schwankungen unterworfen ist, wie die Permeabilität für gelöste Bestandteile.

Im Folgenden sollen von den Permeabilitätsversuchen nur jene angeführt werden, die für die im Vorangehenden besprochenen Erscheinungen von Bedeutung sind.

Bringt man eine mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllte künstliche Zelle in eine hypotonische Lösung, am einfachsten in destilliertes Wasser, so tritt durch Wasseraufnahme eine starke Gewichtssteigerung ein. Um eine Beeinflussung der

Wasseraufnahme durch elastische Anspannung der Muskelmembranen zu vermeiden, muß man dafür Sorge tragen, daß diese zu Beginn des Versuches nach innen gebaucht sind, und daß der Versuch nicht zu lange (am besten etwa 1 Stunde) fortgesetzt wird. Die Gewichtsänderungen weichen bei Muskeln verschiedener Frösche nicht unerheblich voneinander ab, dagegen ist die Permeabilität von Membranen desselben Muskels sehr gleichartig, so daß zwei mit den Muskeln des nämlichen Frosches bespannte Zellen unter den gleichen Bedingungen auch sehr gut übereinstimmende Gewichtsänderungen aufweisen. Dies ist methodisch von Wichtigkeit, denn da, wie wir gleich sehen werden, der Diffusionsversuch selbst bereits eine Änderung der Permeabilitätsverhältnisse herbeiführen kann, ist es bei Untersuchung des Einflusses bestimmter Faktoren erforderlich, stets eine Kontrollzelle mit zu untersuchen, die sich unter genau den gleichen Bedingungen (mit Ausschluß des betreffenden Faktors) befindet.

Die Chlortitration des Zellinhaltes nach Mohr mit $^{n}/_{10}$- oder $^{n}/_{20}$-$AgNO_3$, die unter den gegebenen Verhältnissen die Größe der Salzdiffusion mit einer Genauigkeit von etwa 2 bis 3 % des Gesamtgehaltes zu ermitteln gestattet, lehrt, daß meist auch ein geringes Herausdiffundieren von NaCl erfolgt. (Dieses ist bei Verwendung von destilliertem Wasser als umgebender Lösung auch in dieser durch Titration meßbar, doch empfiehlt sich diese Bestimmung wegen der geringeren Genauigkeit der Methode bei so extremen Verdünnungen viel weniger als die Titration des Zylinderinhaltes.) Es läßt sich nicht mit Bestimmtheit sagen, ob diese geringe (bei ca. 1 stündigen Versuchen mit destilliertem Wasser meist etwa 3 bis 6 % betragende) NaCl-Diffusion auf einer geringen Durchgängigkeit der normalen Muskelzellen für NaCl beruht; denn einmal könnte es sich um eine Diffusion durch die Interstitialräume zwischen den einzelnen Muskelfasern, dann aber auch um eine bereits durch die Wasseraufnahme der Muskelzellen bedingte abnorme Durchlässigkeit handeln.

Führt man nämlich denselben Diffusionsversuch unter ganz den gleichen Bedingungen an ein und derselben künstlichen Zelle mehrmals nacheinander aus, so beobachtet man, daß allmählich eine Zunahme der Salzdiffusion eintritt, die, wenn sie

einen geringen Grad besitzt, von einer leichten Erhöhung der Wasseraufnahme begleitet sein kann, dagegen, wenn die Steigerung der Permeabilität einen höheren Grad erreicht, infolge der Verminderung des osmotischen Druckgefälles zu einer Herabsetzung der Wasseraufnahme führt. Eine besonders deutliche Schädigung der normalen Semipermeabilität wird nachweisbar, wenn man die Muskelmembranen längere Zeit nach dem Versuche in physiologischer NaCl-Lösung liegen läßt. Einige Beispiele mögen das Gesagte erläutern:

Versuch vom 9. I. 16.

Zylinder mit 0,7 %iger NaCl-Lösung gefüllt und in destilliertes Wasser getaucht. Drei unmittelbar aufeinanderfolgende Versuche von je 1 stündiger Dauer.

	1. %	2. %	3. %
Wasseraufnahme	8,0	11,9	8,9
Salzabgabe	4,3	5,4	8,8
Endkonzentration des Zylinderinhaltes .	0,62	0,59	0,52

Der Versuch zeigt die allmähliche Steigerung der Salzpermeabilität, mit der augenscheinlich auch eine Erhöhung der Wasserpermeabilität einhergeht. Denn die durchdiffundierte Wassermenge ist im zweiten Versuche absolut größer, und im dritten zwar dem absoluten Werte nach wieder etwas vermindert, aber in Anbetracht der Verringerung des osmotischen Druckes durch die Salzabgabe relativ noch stärker vermehrt. Dies kommt am deutlichsten zum Ausdruck, wenn man die Endkonzentration berechnet, die der Zylinderinhalt am Schlusse jedes Versuches aufweist. Trotzdem die osmotische Druckdifferenz zu Beginn jedes Versuches stets die gleiche ist (0,7 %ige NaCl-Lösung gegen destilliertes Wasser), sinkt die Endkonzentration immer mehr ab, wie früher ausgeführt, ein klares Zeichen der wachsenden Allgemeinpermeabilität.

Den Einfluß längerer Aufbewahrung in physiologischer Kochsalzlösung (bei Zimmertemperatur) zeigt der folgende Versuch:

Versuch vom 29/30. XII. 15.

Zylinder mit 0,7 %iger NaCl-Lösung gefüllt und in destilliertes Wasser getaucht, in Versuch 1 und 2 für je 70 Minuten, in 3 und 4 für je

60 Minuten. In den Zwischenzeiten zwischen den Versuchen werden die Muskelmembranen in 0,7 %iger NaCl-Lösung aufbewahrt. (Ein vorangehender Versuch mit Alkoholnarkose ist nicht mit angeführt.)

	1	2 (4 1/2 Std. später) %	3 (14 1/2 Std. nach 2) %	4 (24 Std. nach 3) %
Wasseraufnahme .	13,9	6,4	5,8	4,8
Salzabgabe . . .	2,8	14,4	23,4	28,3
Endkonzentration .	0,60	0,56	0,51	0,48

Ebenso wie lange Versuchsdauer und Aufbewahrung führt auch durch Wärmewirkung erzeugte Koagulation des Muskeleiweißes zu einem sehr hohen Grade von Durchlässigkeit, zu einem so gut wie vollkommenen Verlust der Semipermeabilität. Während, wie schon erwähnt, die Salzdiffusion (aus 0,7 %igem NaCl gegen destilliertes Wasser) im allgemeinen beim frischen Muskel in 1 stündigen Versuchen etwa 3 bis 6 % beträgt, zeigten bei 50 bis 60° wärmestarr gemachte Membranen in einem Versuche eine Salzdiffusion von 19,1 %, in einem zweiten Versuche eine solche von 21,7 %.

Der direkte Nachweis dieser Permeabilitätssteigerung führt — in voller Übereinstimmung mit der zuerst von Fletcher gegebenen Erklärung (vgl. S. 51) — die vermeintliche „Entquellung“ nach vorangegangener Wasseraufnahme ebenso wie die verminderte Wasseraufnahme starrer Muskeln aus hypotonischen und sauren Lösungen in einfacher Weise auf das Wirken osmotischer Kräfte zurück. Denn mit dem mehr oder minder weitgehenden Verluste der „Semipermeabilität“, mit dem „Löcherigwerden“ der Membran, die nun auch für die gelösten Bestandteile durchgängig ist, muß ein Herausdiffundieren dieser letzteren in die umgebende Lösung erfolgen und so eine Verminderung des osmotischen Druckes im Zellinneren eintreten.

6. Zusammenfassung.

Die Zerstörung der Gewebsstruktur durch Zerkleinerung bietet ein einfaches Mittel, die kolloidalen und die osmotischen Eigenschaften von Geweben gesondert zu untersuchen.

Versuche mit Muskelbrei ergeben, daß die Gewichtsänderungen des Muskels in anisotonischen Kochsalzlösungen rein

osmotischer, die Wasseraufnahme in sauren Lösungen zum Teil osmotischer und zum Teil kolloidaler Natur ist.

Auch die rein kolloidale Säurequellung des Muskels kann durch Salze gehemmt werden, nicht aber durch Zucker.

Die Säurequellung der Muskelsubstanz verläuft ganz analog jener der unorganisierten Kolloide (wie Fibrin oder Gelatine). Eine spontane „Entquellung“ bei unveränderten äußeren Bedingungen findet nicht statt. Die nachträgliche Wasserabgabe gequollener Muskeln ist osmotischer und nicht kolloidaler Natur.

Die geronnene Muskelsubstanz besitzt kein geringeres, sondern in reinen Säurelösungen sogar ein größeres Wasserbindungsvermögen als die genuine. Damit entfällt jeder sichere Anhaltspunkt für die Deutung der Lösung der Totenstarre als „Entquellungsvorgang“.

Ein isoliertes Studium der Muskelpermeabilität wird ermöglicht durch Messung der Diffusion durch zarte Muskelmembranen. Eine gesonderte quantitative Untersuchung der Wasser- und der Salzdiffusion liefert ein klares Bild der Permeabilitätsverhältnisse. Nicht bloß die Permeabilität für gelöste Bestandteile, sondern auch jene für Wasser ist innerhalb weiter Grenzen veränderlich. Die Permeabilität des normalen Muskels für Kochsalz ist, wenn überhaupt vorhanden, sehr gering; mit der Dauer der Aufbewahrung steigt sie an und führt schließlich zu einer fast freien Salzdurchgängigkeit (völligem Verlust der „Semipermeabilität“). Koagulation des Muskeleiweißes hat die gleiche Wirkung. Hierdurch finden die vermeintlichen „Entquellungsvorgänge“ ihre einfache Erklärung.

Beiträge zur Kenntnis der Narkose.

IV. Mitteilung.

Narkose und Permeabilität.

Von

Hans Winterstein.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Rostock.)

(Eingegangen am 18. März 1916.)

1. Der Stand des Problems.

Sieht man von gelegentlichen Beobachtungen ab, die sich im Sinne einer Beeinflussung der normalen Grenzflächenbeschaffenheit tierischer und pflanzlicher Zellen durch die Narkotica deuten lassen, so scheint Alcock[1]) der erste gewesen zu sein, der die Annahme solcher Veränderungen zur Grundlage von Vorstellungen über den Mechanismus der Narkose gemacht hat. Alcock fand zunächst in Versuchen an Froschnerven (Part I), daß Chloroformdampf, der bei Einwirkung auf den ganzen Nerven ein Absinken des Ruhestromes herbeiführt, bei lokaler Applikation auf das durchschnittene Ende eine Steigerung, bei solcher auf den Längsschnitt dagegen eine Verminderung des Ruhestromes veranlaßt, mithin ebenso wirkt wie eine Verletzung. Bei rechtzeitiger Entfernung des Chloroformdampfes konnte eine Erholung beobachtet werden. Ähnlich, nur schwächer wie Chloroform, wirkte Äther. Da eine nennenswerte Änderung des Widerstandes nicht feststellbar war, mußte die Wirkung dieser Substanzen auf einer Verminderung der Polarisation beruhen. Versuche an der isolierten Froschhaut

---

[1]) N. H. Alcock, The action of anaesthetics on living tissues. Part I. Proc. Roy. Soc. London (B), 77, 267, 1906; Part II. ibid. 78, 159, 1906.

(Part II) ergaben, daß Chloroformdampf bei Einwirkung auf die Innenfläche wirkungslos bleibt, bei Applikation auf die Außenfläche aber eine Aufhebung des Ruhestromes herbeiführt. Zur Erklärung dieser Erscheinungen entwickelte Alcock eine schematische Struktur, die in der Annahme gipfelt, daß die Zellen an der Außenseite von einer semipermeablen Membran begrenzt sind, welche eine Art von Ionen rascher passieren läßt. Durch Chloroform würde dieser semipermeable Mechanismus vernichtet. Da auch die an Nerven beobachteten Erscheinungen sich dieser Anschauungsweise gut einordnen ließen, so würde die Wirkung der Narkotica ganz allgemein darin zu suchen sein, daß sie durch Erhöhung der Durchlässigkeit der Zellmembran den semipermeablen Apparat der Zelle zerstören.

Es muß darauf hingewiesen werden, daß die Schlußfolgerung Alcocks, daß die Störung des semipermeablen Mechanismus, sofern es sich überhaupt um eine solche handelt, auf einer Erhöhung der Durchgängigkeit beruhe, aus der Verminderung des Ruhestromes allein nicht ableitbar ist. Denn eine Abschwächung des elektrischen Potentials gestattet auch vom Standpunkte der Membrantheorie noch keinen Schluß auf die Art ihres Zustandekommens, weil sie offenbar ebensogut durch eine Erhöhung der Durchgängigkeit der schlecht permeierenden Ionen, wie durch eine Verminderung der Durchgängigkeit der gut permeierenden Ionen bedingt sein könnte. Wohl aber würde die von Alcock bei lokaler Applikation des Narkoticums auf den Nerven beobachtete Negativität der betroffenen Stelle entschieden im Sinne einer Erhöhung sprechen, ebenso wie ganz analoge Versuche, die Galeotti und di Cristina[1]) an unversehrten Froschsartorien anstellten, und in denen sie bei lokaler Applikation narkotischer Dämpfe das Auftreten einer Potentialdifferenz beobachteten, bei der der narkotisierte Teil sich stets negativ erwies. Doch erwähnen die Autoren, daß diese Erscheinung niemals völlig reversibel war, und auch Höber beobachtete in seinen später zu be-

---

[1]) G. Galeotti e G. di Cristina, Correnti di demarcazione nei muscoli di rana in diverso modo alterati. Ztschr. f. allg. Physiol. 10, 1, 1910.

sprechenden Versuchen eine solche Negativität nur bei irreversibel toxischen Konzentrationen.

Die Annahme einer Erhöhung der Permeabilität hat auch H. H. Meyer[1]) den Vorstellungen zugrunde gelegt, durch die er vom Standpunkte der Lipoidtheorie aus den Mechanismus der Narkose zu erklären suchte. Gestützt auf die Beobachtungen Alcocks und auf Versuche von Chiari[2]), der unter dem Einfluß narkotischer Dämpfe ebenso wie bei einer durch Gefrieren bedingten Zersprengung der Zellen eine bedeutende Beschleunigung der Autolyse in der Leber feststellen konnte, nahm Meyer an, daß die Narkotica vermöge ihrer lipoidlösenden Wirkung die Lipoidmembranen, welche die Zellen von außen begrenzen und die Zwischenwände des schaumig strukturierten Protoplasmas bilden würden, auflockern und so eine „Änderung der normalbegrenzten Ionenpermeabilität“ bewirken, die eine Grundbedingung für den chemischen Prozeß der Erregung bedeutet. Höber[3]) hat gegenüber dieser Auffassung hervorgehoben, daß die lipoidlösende Wirkung der Narkotica, wie sie bei der durch sie bedingten Hämolyse besonders deutlich zutage tritt, nicht bei narkotischen, sondern erst bei viel höheren, irreversibel toxischen Konzentrationen zu beobachten ist, während schwache Konzentrationen nach Angabe verschiedener Autoren eine Fällung der Lipoide, also eine Verdichtung der Plasmahaut bewirken würden. So berechtigt aber auch Höbers Hinweis auf die Notwendigkeit ist, bei Erklärung des Wirkungsmechanismus der Narkotica die Konzentration zu berücksichtigen, in der sie ihre Wirkung entfalten, so läßt sich gegen die letztgenannte Deutung wieder einwenden, daß eine Verringerung des Dispersitätsgrades der Plasmahautkolloide durchaus nicht mit einer Verminderung der Permeabilität verbunden zu sein braucht, sondern auch mit einer Erhöhung derselben einhergehen könnte, und, wie wir noch sehen werden, auch tatsächlich einhergeht.

---

[1]) H. H. Meyer, Über die Beziehungen zwischen Lipoiden und pharmakologischer Wirkung. Münch. med. Wochenschr. **56**, 1577, 1909.

[2]) R. Chiari, Beeinflussung der Autolyse durch die Narkotica der Fettreihe. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **60**, 256, 1909.

[3]) R. Höber, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. 4. Aufl. **1914**, 465.

Gerade zu den entgegengesetzten Vorstellungen wie die vorangehenden Autoren gelangten auf Grund ihrer Versuche Höber und Lillie. Höber[1]) beobachtete, daß die durch lokale Applikation verschiedener Salze auf den Muskel erzeugten „Salzruheströme“ durch Narkotika abgeschwächt bzw. aufgehoben werden. Da nun diose Salzruheströme analog den durch Erregung erzeugten Aktionsströmen auf einer Änderung des Zustandes der Plasmahautkolloide beruhen würden, so würde die Narkose in einer Hemmung oder Verhinderung dieses dem Erregungsvorgange zugrunde liegenden „Kolloidprozesses“ bestehen. Eine Bestätigung dieser Auffassung erblickte er in dem Umstande, daß die bei Einwirkung von Kaliumsulfat auf den Nerven sonst färberisch nachweisbare „Auflockerung der Achsenzylinder“ bei gleichzeitiger Narkose des Nerven ausbleibt.

Gleichfalls in der Feststellung eines Antagonismus zwischen Narkose und Salzwirkung gipfeln die Versuche von Lillie[2]). Als Versuchsobjekt dienten ihm vor allem die Larven des Wurmes Arenicola. Diese zeigen beim Einbringen in eine reine dem Seewasser isotonische Kochsalzlösung gleichzeitig eine sehr starke, nach kurzer Zeit vorübergehende Contraction der gesamten Muskulatur, einen Austritt des in den Zellen enthaltenen gelben Pigmentes und einen mit Zerfall einhergehenden Stillstand der Cilienbewegung. Alle diese Folgen können nun durch die verschiedensten Narkotica (die in starken Dosen selbst die gleichen Wirkungen erzeugen) in entsprechender Konzentration gehemmt, in ganz schwachen wenigstens gemildert werden. In dem vollständigen Parallelismus, der hierbei zwischen Muskelcontraction und Pigmentaustritt zu beobachten ist, sieht der Verfasser einen klaren Beweis dafür, daß sowohl der in der Contraction zutage tretende Erregungszustand wie die in der Pigmentdiffusion sich äußernde Cytolyse auf der gleichen Ursache, nämlich einer Permeabilitätssteigerung beruhen, die durch

---

[1]) R. Höber, Beiträge zur physikalischen Chemie der Erregung und der Narkose. Arch. f. d. ges. Physiol. 120, 492, 1907.

[2]) R. S. Lillie, On the connection between changes of permeability and stimulation etc. Amer. Journ. of Physiol. 24, 14, 1909. — Antagonism between salts and anaesthetics. I. ibid. 29, 372, 1912; II. ibid. 30, 1, 1912; III. ibid. 31, 255, 1913. — The physico-chemical conditions of anaesthetic action. Science, N. S. 37, 764, 1913.

die Narkose behindert werden. Höber[1]) erblickt dagegen gerade in diesem Parallelismus nicht mit Unrecht einen Einwand gegen die Beweiskraft der Versuche, da die Möglichkeit besteht, daß der Pigmentaustritt lediglich eine Folge der starken (und durch die Narkose verminderten) Muskelcontraction darstellt und mit einer Permeabilitätsänderung gar nichts zu tun hat. Gegen diesen Einwand spricht allerdings der Umstand, daß Lillie (l. c. II) einen solchen Pigmentaustritt in isotonischen Lösungen reiner Na- oder K-Salze und seine Verhinderung durch Narkotica auch an Seeigeleiern (von Arbacia) feststellen konnte.

Im Sinne seiner obigen Auffassung deutet Lillie[2]) auch die folgende Beobachtung: J. Loeb hat bekanntlich entdeckt, daß unbefruchtete Seesterneier durch verschiedene Agentien zur Bildung einer Furchungsmembran veranlaßt und durch Nachbehandlung mit hypertonischen Salzlösungen oder schwachen Cyansalzlösungen vor dem sonst meist eintretenden Zerfall bewahrt und zur weiteren parthenogenetischen Entwicklung gebracht werden können. Lillie fand nun, daß bei Asteriaseiern, die durch Einwirkung von Fettsäuren oder Erwärmen zur Bildung einer Furchungsmembran veranlaßt wurden, auch eine Nachbehandlung mit verschiedenen Narkoticis die sonst drohende Cytolyse zu verhindern vermag.

Während Höber auf Grund seiner Versuche zunächst bloß die allgemeine und in ihrer Unbestimmtheit die Erkenntnis wenig fördernde Schlußfolgerung gezogen hatte, daß die Narkose den der Erregung zugrunde liegenden „Kolloidvorgang“ hemme, entwickelte Lillie in überaus klarer Weise eine jetzt auch von Höber vertretene „Permeabilitätstheorie“ der Narkose, die, wenn sich ihre Grundlagen als richtig erweisen, allen Anforderungen an eine allgemeine Narkosetheorie entspräche, da sie eine Zurückführung der narkotischen Herabsetzung der Erregbarkeit auf das allgemeine Problem der Erregung bedeuten würde.

Lillie geht aus von der Membrantheorie, welche die an den ruhenden Geweben nachweisbaren elektromotorischen Kräfte

[1]) R. Höber, Physikalische Chemie l. c. S. 466.

[2]) Lillie, The physiology of cell-division. V. Journ. of exper. Zool. 15, 28, 1913.

als die Folgen einer durch die ungleiche Ionenpermeabilität der Plasmahaut bedingten Polarisation derselben auffaßt und dementsprechend die mit der Erregung einhergehenden Änderungen des elektrischen Potentials als Folgen einer Änderung dieser Permeabilität deutet. Diese Auffassung findet eine feste Stütze in dem Nernstschen Erregungsgesetz, das uns den Ausgangspunkt des Erregungsvorganges in einer Änderung der Ionenkonzentration suchen läßt, für deren Zustandekommen wohl nur an den Zellgrenzflächen Bedingungen gegeben sind. Gestützt nun auf den vollkommenen Parallelismus, den seine oben erwähnten Versuche für die Beeinflussung des Erregungsprozesses einerseits und der cytolytischen Wirkungen andererseits durch verschiedene Agentien ergeben haben, sieht Lillie das Wesen des Erregungsvorganges in Veränderungen der Plasmahaut, die mit einer Erhöhung ihrer Durchgängigkeit einhergehen. Dementsprechend müssen alle Faktoren, die auf irgendwelche Weise dieser Erhöhung der Durchgängigkeit entgegenwirken, die Erregbarkeit herabsetzen bzw. den Erregungsprozeß völlig unmöglich machen. Zu diesen Faktoren würden die Narkotica gehören, die durch ihre Ansammlung in den Lipoiden der Plasmahaut den Eintritt der Permeabilitätssteigerung verhindern und so einerseits die Erregbarkeit herabsetzen bzw. aufheben, und andererseits „antitoxisch" gegen alle Agentien wirken, die, wie die reinen Salzlösungen oder die zur Anregung der künstlichen Parthenogenese dienenden Stoffe, ihre Giftwirkung durch eine schließlich zur Cytolyse führende Erhöhung der Plasmahautpermeabilität ausüben.

So ansprechend diese Theorie erscheint, so sind doch die bisher angeführten Argumente von Höber und Lillie nur indirekt und unsicher, da sie sich auf die Feststellung beschränken, daß die Narkotica Wirkungen zu verhüten imstande sind, deren Zurückführung auf eine Permeabilitätssteigerung zwar wahrscheinlich sein mag, aber doch immer nur hypothetisch ist. Der erste, der direkte Versuche über den Einfluß der Narkotica auf die Permeabilität der Plasmamembran anstellte, war Lepeschkin[1]. Von der Vorstellung ausgehend, daß die

[1] W. W. Lepeschkin, Über die Einwirkung anästhesierender Stoffe auf die osmotischen Eigenschaften der Plasmamembran. Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 29, 349, 1911.

Narkotica in schwacher, den Dispersitätsgrad der Eiweißkörper nicht unmittelbar ändernder Konzentration die chemische Zusammensetzung des Dispersionsmittels der Plasmamembran in dem Sinne ändern müßten, daß die in den Narkoticis schlecht, in Wasser dagegen gut löslichen Stoffe sie schwerer zu durchdringen vermögen, untersuchte er, ob die Permeabilität für solche Substanzen, wie Salze und Anilinfarbstoffe, während der Narkose eine Verminderung erfahre. Er fand zunächst, in Bestätigung gelegentlicher Angaben von Pfeffer, der an chloroformierten Wurzelhaaren von Trianea eine Verlangsamung der Farbstoffspeicherung gegenüber der Norm beobachtet hatte, daß lebende (nicht aber getötete) Spirogyrazellen in Äthernarkose das in Äther unlösliche Methylenblau oder Methylgrün schwächer aufnehmen als ohne Narkose, während bei Verwendung des in Äther löslichen Bismarckbrauns kein Unterschied in der Färbung zu erkennen war.

Die Beweiskraft dieser Versuche ist jedoch in Anbetracht des komplizierten und noch nicht genügend geklärten Mechanismus der Farbstoffspeicherung wohl nicht sehr hoch zu bewerten, zumal Ruhland[1]) bei Wiederholung dieser Versuche weder mit dem in Äther völlig unlöslichen Methylengrün noch mit dem in Äther sehr gut löslichen Neutralrot einen Unterschied in der Farbstoffspeicherung zwischen unnarkotisierten und mit Äther narkotisierten Spirogyrafäden festzustellen vermochte.

Von größerer Bedeutung dagegen sind Lepeschkins mit der plasmolytischen Methode ausgeführte quantitative Bestimmungen, die in der Tat ergaben, daß die Blattepidermis-Zellen von Tradescantia discolor unter dem Einfluß von 0,05 bis 0,12 $^0/_0$ igem Chloroformwasser und 1 bis $2^1/_2$ $^0/_0$ igem Ätherwasser eine Verminderung der Permeabilität für Salpeter zeigen, während höhere Chloroformkonzentrationen (von 0,2 $^0/_0$ an) nicht bloß keine Verminderung, sondern sogar eine Erhöhung der Permeabilität bewirkten, die der Verfasser auf eine Koagulation der Eiweißkörper der Plasmahaut und einen dadurch bedingten Verlust ihrer selektiven Permeabilität zurückführt.

In bester Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen

[1]) W. Ruhland, Studien über die Aufnahme von Kolloiden durch die pflanzliche Plasmahaut. Jahrb. f. wiss. Botan. 51, 376, 1912.

Lepeschkins stehen die Ergebnisse der Versuche, die Osterhout[1]) über den Einfluß der Narkotica auf die elektrische Leitfähigkeit von Rollen anstellte, die aus einer großen Zahl von Laminariascheiben zusammengesetzt waren. Er fand, daß die Narkotica in schwachen Konzentrationen (1 $^0/_0$ Äther, 0,05 $^0/_0$ Chloroform, 0,05 $^0/_0$ Chloralhydrat, 3 $^0/_0$ Alkohol) eine reversible Verminderung, in starken Konzentrationen eine irreversible Erhöhung der Leitfähigkeit herbeiführen, und schloß daraus, daß die Narkose, deren wichtigstes Kennzeichen die Reversibilität darstelle, mit einer Verminderung der Permeabilität einhergehe.

Gegen diese Versuche läßt sich jedoch einwenden, daß die Bestimmung des Kohlrauschschen Widerstandes allein noch keine sichere Schlußfolgerung gestattet, weil dieser nicht bloß von der Permeabilität, sondern auch von der Zahl der freien Ionen abhängt, die durch Stoffwechselveränderungen in der Narkose eine nicht zu übersehende Beeinflussung erfahren könnte. Auch fehlt bei diesen Versuchen ebenso wie bei jenen Lepeschkins ein direkter Nachweis, daß die beobachtete Permeabilitätsänderung auch wirklich mit einer „Narkose“, d. h. mit einer reversiblen Verminderung irgendwelcher Lebensfunktionen verbunden war, was bei den beträchtlichen Verschiedenheiten in der Empfindlichkeit gegen narkotische Gifte aus der angewandten Konzentration allein nicht mit Sicherheit gefolgert werden kann.

Der gleiche Einwand trifft — und in noch viel höherem Maße — natürlich die Versuche von Loewe[2]), der an künstlichen Lipoidmembranen unter dem Einfluß der Narkotica gleichfalls eine Abnahme der elektrischen Leitfähigkeit feststellen konnte. So interessant solche Modellstudien sind, und so wertvoll sie in Kombination mit entsprechenden Versuchen an lebendem Material sein können, für sich allein dürfen sie jedenfalls nicht als Grundlage einer Narkosetheorie dienen, da die Plasmahaut ganz sicher keine reine Lipoidmembran ist und der Begriff der Narkose hier jede präzise Bedeutung verliert.

Die ersten direkten Beobachtungen über den Einfluß von

---

[1]) W. J. V. Osterhout, The effect of anaesthetics upon permeability. Science 37, 111, 1911.

[2]) S. Loewe, Membran und Narkose. Diese Zeitschr. 57, 161, 1913.

Narkoticis auf die Permeabilität tierischer Zellen dürfte (wenn man von der schon erwähnten hämolytischen Wirkung starker Konzentrationen absieht) J. Loeb[1]) gemacht haben. Seine Untersuchungsmethode bestand in der Messung der Zeit, welche die normalerweise für Salze und für Wasser undurchgängigen befruchteten Funduluseier brauchen, um in stark hypertonischen Salzlösungen so weit zu schrumpfen, daß sie zu Boden sinken. Es ergab sich, daß dieser Vorgang durch 2 m-Methyl-, m-Äthyl-, $^{m}/_{8}$-Butylalkohol in ungefähr gleicher Weise beschleunigt wurde, was eine Erhöhung der Permeabilität durch diese Stoffe erweisen würde. Auch bei diesen, übrigens nicht in Hinblick auf das Narkoseproblem angestellten Versuchen fehlt jede Beziehung zu der „narkotischen" Wirksamkeit und daher jede Möglichkeit einer sicheren Schlußfolgerung, zumal sich die Angabe findet, daß kleine, nicht genauer bestimmte Alkoholkonzentrationen das Absinken der Eier vielleicht geringfügig verzögern, die Permeabilität also leicht vermindern würden.

Ganz analoge Gründe aber schwächen auch die Beweiskraft der Versuche, die neuerdings Joel[2]) auf Anregung Höbers über die Einwirkung der Narkotica auf die Permeabilität roter Blutkörperchen angestellt hat und auf Grund deren Höber[3]) zu einer Permeabilitätstheorie der Narkose gelangt, die mit jener Lillies völlig übereinstimmt. Schon Arrhenius und Bubanovic[4]) hatten bei ihren Versuchen über Hämolyse einige Beobachtungen über eine Verlangsamung derselben bei Einwirkung schwacher, und eine Beschleunigung bei Einwirkung starker Narkoticumkonzentrationen gemacht. Joel untersuchte nun durch Messung der elektrischen Leitfähigkeit abzentrifugierten Blutkörperchenbreies den Einfluß, den der Zusatz verschiedener Narkotica auf den Ablauf der langsamen Hämolyse in 10%

---

[1]) J. Loeb, Untersuchungen über Permeabilität und antagonistische Elektrolytwirkung nach einer neuen Methode. Diese Zeitschr. 47, 127, 1912.

[2]) A. Joel, Über die Einwirkung einiger indifferenter Narkotica auf die Permeabilität roter Blutkörperchen. Arch. f. d. ges. Physiol. 161, 5, 1915.

[3]) R. Höber, Neue Versuche zur Theorie der Narkose. Deutsche med. Wochenschr. 41, 273, 1915.

[4]) Zit. nach Joel.

Rohrzuckerlösung ausübt. Er beobachtete durchwegs, daß kleine Konzentrationen eine (zum Teil reversible) Verlangsamung der Hämolyse, also Verminderung der Permeabilität, starke Konzentrationen dagegen eine Beschleunigung derselben, also Erhöhung der Permeabilität herbeiführen.

Den Nachweis aber, daß wirklich, wie die Lillie-Höbersche Theorie annimmt, die Permeabilitätsverminderung der „Narkose" entspricht und nicht etwa die Permeabilitätserhöhung, ist auch Joel begreiflicherweise schuldig geblieben. Es ließe sich aber, wie besonders Traube[1]) eingewendet hat, manches Argument zugunsten der letzteren Deutung anführen. Traube verweist auf die von ihm beobachtete gellösende Wirkung der Narkotica sowie auf die Tatsache, daß die Narkotica in den Konzentrationen, in denen sie kolloidfällend wirken, — welche Erscheinung Joel, ebenso wie früher schon Höber[2]) zugunsten einer permeabilitätsvermindernden Wirkung heranzuziehen sucht — eine Erhöhung der Leitfähigkeit, also auch der Permeabilität herbeiführen. Auch der Umstand, daß bei ansteigender Konzentration die Narkose doch nicht aufhört, wie dies die gegensinnige Änderung der Leitfähigkeit erwarten ließe, daß vielmehr das Erregungsstadium der Narkose vorausgeht und nicht ihr nachfolgt, würde zugunsten der Auffassung sprechen, daß nicht die anfängliche Verminderung, sondern die darauffolgende Erhöhung der Permeabilität der Narkose entspricht. — Obwohl, wie wir sehen werden, die Einwände Traubes nicht zutreffend sind, so können sie doch auf keinen Fall an Objekten widerlegt werden, bei denen jedes brauchbare Kriterium der „Narkose" überhaupt fehlt.

Die relativ besten, wenn auch noch keineswegs völlig eindeutigen Argumente zugunsten der Permeabilitätstheorie hat neuerdings Mc Clendon[3]) in Versuchen gegeben, die sich an die früher erörterten von Lillie und Loeb anschließen. Er hatte bereits früher gefunden, daß die normalerweise für Salze völlig impermeablen Funduluseier durch verschiedene giftig wirkende

---

[1]) J. Traube, Zur Theorie der Narkose. Arch. f. d. ges. Physiol. **161**, 530, 1915.

[2]) Vgl. S. 73.

[3]) J. F. McClendon, The action of anaesthetics in preventing increase of cell permeability. Amer. Journ. of Physiol. **38**. 173, 1915.

Lösungen durchgängig gemacht wurden, und daß ein Zusatz von Narkoticis den Eintritt dieser Permeabilitätssteigerung verhinderte. Die Weiterführung dieser Versuche an Eiern von Esox ergab nun folgendes: Normalerweise sind die Eier sowohl für Wasser wie für Salze völlig undurchgängig, so daß sie sich in destilliertem Wasser nicht verändern. Werden sie jedoch in schwach giftige Lösungen von Nitraten ($^{n}/_{10}$-$NaNO_3$) gelegt, so erfolgt ein rascher Austritt der in den Eiern enthaltenen Chloride. Während nun „giftig" wirkende Lösungen von Narkoticis die gleiche Wirkung haben wie die Nitrate, wird durch Zusatz von Narkoticis in schwacher „anästhetischer" (die Entwicklung verlangsamender) Konzentration umgekehrt der durch Nitrate erzeugte Salzaustritt verlangsamt. Bezeichnet man die Menge Chloride, die in reiner $^{n}/_{10}$-$NaNO_3$-Lösung in einer bestimmten Zeit herausdiffundieren mit 100, so betrug in einem Versuche diese Menge bei Zusatz von 1 Vol.-$^0/_0$ Alkohol: 60, bei 2$^0/_0$ Alkohol: 50, bei 3$^0/_0$: 45, bei 4$^0/_0$ 60; 6$^0/_0$ Alkohol wirkte schon „toxisch", d. h. für sich allein bereits permeabilitätssteigernd. Ähnlich war der Einfluß von Äther, der in 0,5$^0/_0$ Konzentration die ausgetretene Chloridmenge auf $^2/_3$ herabsetzte, in 2$^0/_0$ dagegen schon toxisch wirkte.

Die Narkotica würden mithin zwei Wirkungen haben: Bei schwacher Konzentration würden sie durch Verhinderung der der Erregung zugrunde liegenden Permeabilitätssteigerung „Anästhesie" erzeugen, bei höherer dagegen toxisch wirken, indem sie selbst eine Erhöhung der Permeabilität herbeiführen. Wie ersichtlich, stehen diese Versuche mit jenen von Lillie und Höber in bestem Einklang, aber der Zusammenhang zwischen Permeabilitätsänderung und Funktionsverminderung erscheint auch hier insofern zweifelhaft, als die Konzentrationen, bei denen die stärkste Permeabilitätsverminderung beobachtet wurde (3$^0/_0$ Alkohol, 0,5$^0/_0$ Äther), auffallend niedrig sind, und die Frage der Reversibilität der Wirkung bei schwachen und starken Konzentrationen nicht weiter untersucht wurde.

Überblicken wir die Gesamtheit der im vorangehenden besprochenen Versuche, so ergibt sich mit ziemlicher Sicherheit der Nachweis, daß die Narkotica Veränderungen in der Durchgängigkeit der Zellgrenzflächen bewirken und zwar anscheinend

so, daß schwächere Konzentrationen die Permeabilität oder doch die durch irgendwelche Einflüsse sonst zu erzielende Permeabilitätssteigerung vermindern, stärkere dagegen die Permeabilität erhöhen. Über die Beziehungen aber, die zwischen diesen Permeabilitätsänderungen und der eigentlichen Narkose, d. h. der reversiblen Herabsetzung der Funktionstätigkeit bestehen und die offenbar von ausschlaggebender Bedeutung sein müssen, wenn diese Erscheinungen als Grundlage einer Theorie der Narkose dienen sollen, konnte bisher keine hinreichende Klarheit geschaffen werden.

Aus diesem Grunde schien es angezeigt, neue quantitative Untersuchungen über die Beeinflussung der Permeabilität durch die Narkotica an solchen Objekten anzustellen, über deren Funktionszustand wir uns gleichzeitig leicht orientieren können. Hierzu schienen die Muskeln am ehesten geeignet.

2. Versuche.

Die ersten Versuche wurden an Froschsartorien mittels der üblichen Wägungsmethode angestellt auf Grund der folgenden Überlegung: Da die Gewebszellen, wie wir durch Overtons Untersuchungen wissen, für Narkotica frei permeabel sind, so wird durch den Zusatz eines Narkoticums zu einer anisotonischen Salzlösung die osmotische Druckdifferenz zwischen dieser und dem Zellinneren nicht geändert. Bringt man also zwei Sartorien in die gleiche anisotonische Lösung, die für den einen noch den Zusatz eines Narkoticums enthält, so müssen, wenn eine Beeinflussung der Permeabilität nicht erfolgt, beide die gleichen Gewichtsänderungen aufweisen; eine Änderung der Permeabilität hingegen wird in einer Verschiedenheit der Gewichtsänderungen zum Ausdruck kommen. Es ergab sich nun in der Tat, daß in einer hypotonischen NaCl-Lösung, die einen Zusatz von 4 bis 5 % Alkohol (der narkotisch wirkenden Konzentration) enthält, die Gewichtszunahme des Sartorius zum Teil beträchtlich geringer war als in der gleichen Lösung ohne Alkohol. So betrug z. B. die Gewichtszunahme eines Sartorius bei Übertragung aus 0,7 % in 0,35 % NaCl-Lösung in 1 Stunde 32,3 %, die des zweiten Sartorius des gleichen Frosches bei Übertragung aus 0,7 % NaCl + 4 % Alkohol in 0,35 % NaCl + 4 % Alkohol bloß 22 %, in einem zweiten analogen Versuch

38,2% gegen 28,7%, in einem dritten, nur ¾ Stunden dauernden Versuch sogar 26% gegen 8,5% usw. — Geht man von der bei solchen Versuchen bisher stillschweigend stets gemachten Voraussetzung aus, daß lediglich die Permeabilität für die gelösten Bestandteile einer Änderung zugänglich sei, so müßte man aus diesen Beobachtungen schließen, daß bei Anwesenheit des Narkoticums durch Austritt osmotisch wirksamer Bestandteile in die umgebende Lösung eine Verminderung des osmotischen Druckgefälles und daher eine Verminderung der Wasseraufnahme erfolgt sei, daß also der Alkohol in narkotischer Konzentration eine Erhöhung der Permeabilität bewirkt habe.

Da aber Versuche mit hypertonischen Salzlösungen nicht zu übereinstimmenden Ergebnissen führten und überdies die Möglichkeit bestand, die Verminderung der Wasseraufnahme bei Anwesenheit von Alkohol auf unmittelbare Änderungen des osmotischen Druckes im Zellinneren (durch Beeinflussung des Stoffwechsels) oder auf Änderung des Wasserbindungsvermögens zurückzuführen, so wurde diese Methode aufgegeben und das Verfahren eingeschlagen, das ich kürzlich beschrieben habe[1]), und das in der direkten Untersuchung der Durchgängigkeit von Muskelmembranen für Salze und Wasser besteht. Bezüglich der Einzelheiten sei auf die frühere Arbeit verwiesen und hier nur ganz kurz das Wesentliche der Methode in ihrer besonderen Anwendung für den vorliegenden Zweck skizziert:

Zwei gleich große Glaszylinder von ca. 2 ccm Inhalt wurden mit vorher gewogenen Muskelmembranen bespannt, die aus den zarten Seitenteilen des Bauchmuskels einer weiblichen Esculenta herausgeschnitten waren. Der eine Zylinder wurde mit 0,7% NaCl-Lösung, der zweite mit der gleichen NaCl-Lösung, die noch einen bestimmten Prozentgehalt des auf seine Wirkung zu untersuchenden Narkoticums enthielt, gefüllt, und die Flüssigkeitsmenge in jedem durch Wägung bestimmt. Dann wurden beide Zylinder für eine bestimmte Zeit, in der Regel etwa 1 Stunde, in eine hypotonische Lösung (meist einfach destilliertes Wasser) getaucht, die für den Narkoseversuch

---

[1]) H. Winterstein, Über osmotische und kolloidale Eigenschaften des Muskels. Diese Zeitschr. 75, 48, 1916.

wieder den gleichen Prozentgehalt des betreffenden Narkoticums aufwies, so daß die osmotische Druckdifferenz bei beiden Zylindern die gleiche war. Am Ende des Versuches wurde durch neuerliche Wägung des Gesamtzylinders und der Muskelmembranen die eingetretene Wasseraufnahme ermittelt.

Es ergab sich in Übereinstimmung mit den obigen Versuchen am Sartorius, daß Alkohol (5 bis 6 Vol.-%), Chloroform (0,1 bis 0,12 Vol.-%), Äther (3 Vol.-%), Urethan (3 Vol.-%) in stark narkotischer Konzentration eine deutliche Herabsetzung der Wasseraufnahme, mitunter auf einen Bruchteil der normalen bewirken. Worauf ist nun diese Verminderung der Wasseraufnahme unter Bedingungen, unter denen lediglich Änderungen der Permeabilität in Frage kommen, zurückzuführen? Die nächstliegende Annahme ist, wie schon erwähnt, die einer Vermehrung der Salzpermeabilität und einer durch die erhöhte Salzdiffusion bedingten Verminderung des osmotischen Druckgefälles unter dem Einfluß der Narkose; offenbar aber könnte die Erscheinung in gleicher Weise auch durch die bisher kaum jemals in Betracht gezogene Annahme einer Verminderung der Wasserpermeabilität ihre Erklärung finden.

Eine Entscheidung dieser Frage ist, wie in meiner oben zitierten Arbeit genauer dargelegt wurde, in einfacher Weise möglich durch direkte Messung der Salzdiffusion vermittels Chlortitration des Zylinderinhaltes. Bei Erhöhung der Permeabilität muß die Salzdiffusion offenbar vergrößert, der Salzgehalt daher am Ende des Versuchs gegenüber der Norm herabgesetzt sein, während die Verminderung der Permeabilität für Wasser zum mindesten nicht mit einer Vermehrung, sondern eher mit einer Verringerung der Salzdiffusion einhergehen wird. Auf jeden Fall wird auch bei gleichzeitigen Änderungen der Permeabilität für Wasser und für Salze die aus der Wasseraufnahme und Salzabgabe leicht zu berechnende Endkonzentration des Zylinderinhaltes am Ende des Diffusionsversuchs einen getreuen Maßstab der Allgemeinpermeabilität darstellen, da der in der gleichen Zeit erreichte osmotische Ausgleich offenbar ein um so vollständigerer, die Endkonzentration also eine um so niedrigere sein muß, je größer die Permeabilität der Muskelmembranen ist.

Die Resultate unserer Untersuchungen sollen an der Hand

der folgenden Protokolle abgeleitet werden, die aus einer größeren Zahl in ihrem Endergebnis gut übereinstimmender Versuche ausgewählt sind.

Versuch 53. 21. XII. 15.
Narkose mit 3 Vol.-% Äthylurethan.

	Narkoseversuch	Kontrollversuch
	Zylinder mit 0,7% NaCl + 3% Urethan gefüllt und für 3/4 Std. in Aq. dest. + 3% Urethan getaucht	Zylinder mit 0,7% NaCl gefüllt und für 3/4 Std. in Aq. dest. getaucht
Wasseraufnahme . . .	2,2%	5,6%
Salzabgabe	4,7%	5,7%
Endkonzentration des Zylinderinhalts . .	0,65%	0,63%
	Die Muskeln beider Zylinder kommen auf etwas über 1 Std. in 0,7% NaCl-Lösung; hierauf werden beide Zylinder mit 0,7% NaCl gefüllt und wieder für 3/4 Std. in Aq. dest. getaucht	
Wasseraufnahme . . .	8,1%	9,0%
Salzabgabe	3,6%	3,1%
Endkonzentration . .	0,62%	0,62%

Versuch 54. 22. XII. 15.
Narkose mit 6 Vol.-% Äthylalkohol.

	Narkoseversuch	Kontrollversuch
	Zylinder mit 0,7% NaCl + 6% Alkohol gefüllt und für 1 Std. in Aq. dest. + 6% Alkohol getaucht	Zylinder mit 0,7% NaCl gefüllt und für 1 Std. in Aq. dest. getaucht
Wasseraufnahme . . .	1,4%	7,2%
Salzabgabe	1,1%	1,6%
Endkonzentration . .	0,68%	0,64%
	Die Muskeln beider Zylinder kommen auf 50 Min. in 0,7% NaCl; hierauf werden beide Zylinder mit 0,7% NaCl gefüllt und für 50 Min. in Aq. dest. getaucht	
Wasseraufnahme . . .	8,1%	8,3%
Salzabgabe	0%	0,4%
Endkonzentration . .	0,65%	0,64%

Versuch 55. 23. XII. 15.
Narkose mit 3 Vol.-% Äther.

	Narkoseversuch	Kontrollversuch
	Zylinder mit 0,7% NaCl + 3% Äther gefüllt und für 1 Std. in Aq. dest. + 3% Äther getaucht	Zylinder mit 0,7% NaCl gefüllt und für 1 Std. in Aq. dest. getaucht
Wasseraufnahme . . .	5,4%	9,3%
Salzabgabe	6,2%	5,5%
Endkonzentration . .	0,62%	0,61%
	Die Muskeln beider Zylinder kommen auf 1 Std. in 0,7% NaCl; hierauf werden beide Zylinder mit 0,7% NaCl gefüllt und für 50 Min. in Aq. dest. getaucht	
Wasseraufnahme . . .	7,4%	10,4%
Salzabgabe	8,9%	4,4%
Endkonzentration . .	0,59%	0,61%

Versuch 56. 24. XII. 15.

Narkose mit 0,12 Vol.-% Chloroform.

	Narkoseversuch	Kontrollversuch
	Zylinder mit 0,7 % NaCl + 0,12 % $CHCl_3$ gefüllt und für 1 Std. in Aq. dest. + 0,12 % $CHCl_3$ getaucht	Zylinder mit 0,7 % NaCl gefüllt und für 1 Std. in Aq. dest. getaucht
Wasseraufnahme . . .	2,3 %	7,6 %
Salzabgabe	3,8 %	3,5 %
Endkonzentration . .	0,65 %	0,63 %
	Die Muskeln beider Zylinder kommen auf 1 Std. in 0,7 % NaCl; hierauf werden beide Zylinder mit 0,7 % NaCl gefüllt und für 1 Std. in Aq. dest. getaucht	
Wasseraufnahme . . .	11,8 %	7,8 %
Salzabgabe	2,4 %	5,0 %
Endkonzentration . .	0,61 %	0,65 %

Die vorangehenden, mit vier verschiedenen Narkoticis angestellten Versuche zeigen übereinstimmend die bedeutende Herabsetzung der Wasseraufnahme unter dem Einfluß der Narkose. Diese Herabsetzung beruht aber, wie die Untersuchung der Salzdiffusion lehrt, keineswegs auf einer Erhöhung der Salzpermeabilität, sondern auf einer **hochgradigen Herabsetzung der Wasserpermeabilität**, die offenbar eine charakteristische Eigentümlichkeit der Narkose darstellt. Die Salzdurchgängigkeit (deren Bestimmung größeren Fehlern unterworfen ist — die Fehlergrenze dürfte 2 bis 3 % des Gesamtinhalts betragen —) ist, wie in der früheren Arbeit bereits ausgeführt, normalerweise so gering, daß eine etwaige Verminderung derselben unter gewöhnlichen Bedingungen sich dem Nachweis entzieht. Mit Sicherheit aber schließen die angeführten Versuche eine Steigerung derselben in der Narkose aus, wie besonders deutlich darin zum Ausdruck kommt, daß die am Ende des Versuchs erreichte Konzentration des Zylinderinhalts in den Narkoseversuchen stets größer ist als in den Kontrollversuchen. Nach künstlicher Erhöhung der Salzdurchgängigkeit läßt sich, wie wir sehen werden, der permeabilitätsvermindernde Einfluß der Narkotica auch für die Salze direkt nachweisen.

Die durch die Narkose bewirkte **Verminderung der Wasserpermeabilität** erweist sich in allen 4 Versuchen nach Aufhebung der Narkose als **völlig reversibel**. Dies ist in Wahrheit auch bei dem Ätherversuch (Nr. 55) der Fall, bei

dem das Zurückbleiben der Wasseraufnahme hinter der des Kontrollpräparats eine unvollständige Reversibilität vortäuscht. Berücksichtigt man aber die gleichzeitige Steigerung der Salzpermeabilität, so erweist sich die Durchgängigkeit nach Aufhören der Narkose nicht bloß nicht vermindert, sondern wie die niedrigere Endkonzentration des Zylinderinhalts klar zeigt, sogar etwas gesteigert. Eine analoge leichte Erhöhung der Permeabilität ist auch in dem Chloroformversuch (Nr. 56) nachweisbar, wo sie in einer Erhöhung der Wasseraufnahme zum Ausdruck kommt. Wir werden auf diese Erscheinung gleich noch ausführlicher eingehen.

Nachdem Versuche mit ganz schwachem (0,1 bis 0,2 %) Alkohol die Wirkungslosigkeit dieser unternarkotischen Konzentrationen auf die Permeabilitätsverhältnisse ergeben hatten, wurde nun der Einfluß stärkerer, irreversibel toxischer Konzentrationen von Alkohol und Chloroform einer eingehenderen Untersuchung unterzogen. Die Ergebnisse seien wieder an der Hand einiger Versuchsbeispiele erläutert.

Versuch 61. 29. XII. 15.
Wirkung von 10 % Alkohol.

	Alkoholversuch	Kontrollversuch
	Zylinder mit 0,7 % NaCl + 10 % Alkohol gefüllt und für 80 Min. in 10 % Alkohol getaucht	Zylinder mit 0,7 % NaCl gefüllt und für 80 Min. in Aq. dest. getaucht
Wasseraufnahme . . .	0,7 %	11,4 %
Salzabgabe	4,4 %	4,6 %
Endkonzentration des Zylinderinhalts . .	0,66 %	0,60 %
	Kurz nach Beedigung dieses Versuchs werden beide Zylinder mit 0,7 % NaCl gefüllt und für 70 Min. in Aq. dest. getaucht	
Wasseraufnahme . . .	13,9 %	12,6 %
Salzabgabe	2,8 %	7,3 %
Endkonzentration . .	0,60 %	0,58 %

Versuch 72. 18. I. 16.
Vergleich der Wirkung von 10 % Alkohol auf Muskeln, die von NaCl-Lösung und solchen, die von isotonischer KCl-Lösung bespült sind.

	NaCl-Muskeln	KCl-Muskeln
Vorversuch:	Zylinder mit 0,7 % NaCl gefüllt und 1 Std. in Aq. dest. getaucht	Zylinder mit 0,89 % KCl gefüllt und 1 Std. in Aq. dest. getaucht
Wasseraufnahme . . .	11,9 %	11,0 %
Salzabgabe	0,8 %	3,6 %
Endkonzentration . .	0,62 %	0,77 %

Versuch 72 (Fortsetzung).

	NaCl-Muskeln	KCl-Muskeln
Narkoseversuch:	Zylinder gleich darauf mit 0,7 % NaCl + 10 % Alkohol gefüllt und 65 Min. in 10 % Alkohol getaucht	Zylinder gleich darauf mit 0,89 % KCl + 10 % Alkohol gefüllt und 65 Min in 10 % Alkohol getaucht
Wasseraufnahme . . .	4,0 %	5,2 %
Salzabgabe	6,1 %	4,7 %
Endkonzentration . .	0,63 %	0,81 %
Nachversuch:	Versuchsbedingungen die gleichen wie im Vorversuch. Versuchsdauer: 65 Min. in unmittelbarem Anschluß an den Narkoseversuch	
Wasseraufnahme . . .	9,3 %	8,4 %
Salzabgabe	9,7 %	13,3 %
Endkonzentration . .	0,58 %	0,71 %

Versuch 59. 27. XII. 15.

Wirkung von 0,3 Vol.-% Chloroform.

	Chloroformversuch	Kontrollversuch
	Zylinder mit 0,7 % NaCl + 0,3 % $CHCl_3$ gefüllt und 70 Min. in 0,3 % $CHCl_3$-Wasser getaucht	Zylinder mit 0,7 % NaCl gefüllt und 70 Min. in Aq. dest. getaucht
Wasseraufnahme . . .	2,3 %	7,0 %
Salzabgabe	13,7 %	3,8 %
Endkonzentration . .	0,59 %	0,63 %
	Die Muskeln beider Zylinder kommen für 1 Std. in 0,7 % NaCl; hierauf werden beide Zylinder mit 0,7 % NaCl gefüllt und 1 Std. in Aq. dest. getaucht	
Wasseraufnahme . . .	3,9 %	8,1 %
Salzabgabe	28,3 %	3,9 %
Endkonzentration . .	0,48 %	0,62 %

Versuch 60. 28. XII. 15.

Wirkung von 0,3 Vol.-% Chloroform.

	Chloroformversuch	Kontrollversuch
	Zylinder mit 0,7 % NaCl + 0,3 % $CHCl_3$ gefüllt und 75 Min. in 0,3 % $CHCl_3$-Wasser getaucht	Zylinder mit 0,7 % NaCl gefüllt und 75 Min. in Aq. dest. getaucht
Wasseraufnahme . . .	2,1 %	10,6 %
Salzabgabe	18,8 %	5,8 %
Endkonzentration . .	0,56 %	0,60 %
	Die Muskeln beider Zylinder kommen für 6 1/2 Std. in 0,7 % NaCl-Lösung; hierauf werden beide Zylinder mit 0,7 % NaCl gefüllt und 1 Std. in Aq. dest. getaucht	
Wasseraufnahme . . .	6,8 %	7,3 %
Salzabgabe	29,4 %	13,1 %
Endkonzentration . .	0,46 %	0,57 %

Die Versuche mit 10 % Alkohol zeigen, daß auch in dieser hohen Konzentration die beobachtete Verminderung der Permeabilität vollständig reversibel ist. Als Nachwirkung ist in dem zweiten der angeführten Versuche (Nr. 72) wieder eine leichte Steigerung der Permeabilität wahrnehmbar, die in der Zunahme der Salzdiffusion und dem Absinken der Endkonzentration des Zylinderinhalts zum Ausdruck kommt. Ein Unterschied in dem Verhalten von Muskeln, die in NaCl-Lösung, und solchen, die in KCl-Lösung gehalten wurden, war hierbei nicht festzustellen.

Chloroform ruft in der Konzentration von 0,3 Vol.-% überhaupt keine Verminderung mehr, sondern eine starke Zunahme der Permeabilität hervor, die sich in dem bedeutenden Ansteigen der Salzdiffusion äußert. Nach Aufhebung der Narkose aber ist die auch bei permeabilitätsvermindernden Konzentrationen als Nachwirkung angedeutete Erhöhung der Durchgängigkeit noch viel größer und erstreckt sich, wie besonders der zweite Chloroformversuch (Nr. 60) zeigt, augenscheinlich sowohl auf das Wasser wie auf die Salze, da trotz sehr großer Salzabgabe die Wasseraufnahme dennoch höher ist als in der Narkose, so daß die Endkonzentration einen besonders niedrigen Wert erreicht. Die auch in dem Kontrollversuch zu beobachtende, jedoch bei weitem nicht so große Durchgängigkeitserhöhung beruht hier auf der mehrstündigen Aufbewahrung der Muskeln in physiologischer Kochsalzlösung, die, wie in der früher zitierten Arbeit näher ausgeführt, permeabilitätssteigernd wirkt. Diese Permeabilitätssteigerung bei längerer Versuchsdauer ist auch in Anwesenheit von Narkoticumkonzentrationen feststellbar, die an sich permeabilitätsvermindernd wirken, wie die beiden folgenden Versuchsprotokolle zeigen.

Versuch 64. 3. I. 16.

Wirkung von 10 % Alkohol.

In Versuch 1 bis 3 wurde der Zylinder mit 0,7 % NaCl + 10 % Alkohol gefüllt und für je 1 Std. in Aq. dest. + 10 % Alkohol getaucht; in Versuch 4 wurde die Nachwirkung der Alkoholnarkose untersucht, indem der mit 0,7 % NaCl gefüllte Zylinder für 1 Std. in Aq. dest. getaucht wurde.

	Versuch 1 %	Versuch 2 1 Std. nach 1 %	Versuch 3 4 Std. nach 2 %	Versuch 4 (ohne Alk.) gleich nach 3 %
Wasseraufnahme.	2,6	4,2	0,7	0,7
Salzabgabe	3,3	2,5	13,5	25,2
Endkonzentration	0,66	0,64	0,60	0,52

Versuch 65. 3. I. 16.

Ganz analog Versuch 64, nur mit 0,12% Chloroform statt mit Alkohol.

	Versuch 1 %	Versuch 2 1 Std. nach 1 %	Versuch 3 4 Std. nach 2 %	Versuch 4 (ohne $CHCl_3$) gleich nach 3 %
Wasseraufnahme.	4,0	7,4	4,1	4,1
Salzabgabe	2,3	2,9	12,8	20,8
Endkonzentration	0,66	0,62	0,59	0,53

Trotz der allmählichen Erhöhung der Durchgängigkeit, die in der Zunahme der Salzdiffusion zum Ausdruck kommt, bleibt auch nach vielstündiger Einwirkung der permeabilitätsvermindernde Einfluß des 10%igen Alkohols und des 0,12%igen Chloroforms offenbar noch wirksam, wie aus der gewaltigen Steigerung der Salzdiffusion hervorgeht, die sogleich nach Entfernung des Narkoticums zu beobachten ist.

Da nicht anzunehmen ist, daß nach so lange dauernder Einwirkung der Narkotica, welche die Erregbarkeit irréversibel aufhebt, noch Lebensprozesse in den Muskelmembranen sich abspielen, war zu untersuchen, ob die durch die Narkotica bedingte reversible Permeabilitätsverminderung überhaupt an das „Leben" der Gewebe gebunden ist. Zur Entscheidung dieser Frage wurden Versuche an wärmestarren Muskeln und solche mit so hohen Alkoholkonzentrationen angestellt, daß sie wohl sicher eine Eiweißgerinnung bewirken mußten. Das Resultat zeigen die folgenden Protokolle.

Versuch 63. 2. I. 16.

Muskelmembranen 3 Min. in 0,7% NaCl-Lösung von 50 bis 60° In Versuch 1 und 3 wurde der Zylinder mit 0,7% NaCl gefüllt und für je 1 Std. in Aq. dest. getaucht, im Narkoseversuch 2 wurde er mit 0,7% NaCl + 10% Alkohol gefüllt und für 1 Std. in Aq. dest. + 10% Alkohol getaucht.

	1: Vorversuch %	2: Narkoseversuch %	3: Nachversuch %
Wasseraufnahme.	2,6	0,2	1,4
Salzabgabe	21,7	19,7	27,0
Endkonzentration	0,53	0,56	0,50

Versuch 67. 6. I. 16.

Wirkung von 20% Alkohol.

In Versuch 1 wurde der Zylinder mit 0,7% NaCl + 20% Alkohol gefüllt und für 1 Std. in 20% Alkohol getaucht; dann wurden die Muskelmembranen für 1 Std. in 0,7% NaCl-Lösung gebracht und hierauf der mit 0,7% NaCl gefüllte Zylinder für 1 Std. in Aq. dest. getaucht (Versuch 2); dieser gleiche Versuch wurde in 3 wiederholt, nachdem die Muskelmembranen inzwischen weitere 4 Std. in 0,7% NaCl-Lösung gelegen hatten, und gleich darauf wurde in Versuch 4 der Alkoholversuch von 1 nochmals wiederholt.

	Versuch 1 (20% Alk.) %	Versuch 2 (ohne Alk.) 1 Std. nach 1 %	Versuch 3 (ohne Alk.) 4 Std. nach 2 %	Versuch 4 (20% Alk.) gleich nach 3 %
Wasseraufnahme.	2,9	4,5	2,7	2,3
Salzabgabe	4,6	21,4	24,1	17,5
Endkonzentration	0,65	0,56	0,52	0,56

Versuch 68. 6. I. 16.

Ganz analog Versuch 67, aber an bei 50 bis 60° wärmestarr gemachten Muskelmembranen. In 1 Zylinder mit 0,7% NaCl gefüllt und in Aq. dest. getaucht. In 2 gleich darauf mit 0,7% NaCl + 20% Alkohol gefüllt und in 20% Alkohol getaucht. In 3 nach $3^3/_4$ stündigem Aufenthalt der Muskelmembranen in 0,7% NaCl-Lösung Wiederholung des Versuchs 3 und in 4 gleich darauf Wiederholung des Alkoholversuchs. Versuchsdauer je 1 Std.

	Versuch 1 (ohne Alk.) %	Versuch 2 (20% Alk.) gleich nach 1 %	Versuch 3 (ohne Alk.) $3^3/_4$ Std. nach 2 %	Versuch 4 (20% Alk.) gleich nach 3 %
Wasseraufnahme.	1,7	1,8	1,9	2,2
Salzabgabe	29,3	15,9	26,4	15,6
Endkonzentration	0,49	0,58	0,54	0,58

Diese Versuche zeigen, daß die permeabilitätsvermindernde Wirkung des Alkohols auch an völlig leblosem Material nachweisbar ist. Die Wärmestarre beseitigt, wie schon in der früheren Arbeit mitgeteilt, die normale Semipermeabilität der Muskeln

so gut wie vollständig. Der Alkohol vermag sie natürlich nicht wieder herzustellen, bewirkt aber eine nunmehr an der Herabsetzung der Salzdiffusion kenntliche und wiederum völlig reversible Verminderung der Durchgängigkeit. Diese Tatsache läßt die wichtige Schlußfolgerung zu, daß die durch die Narkotica bewirkte Permeabilitätsverminderung nicht auf Beeinflussung irgendwelcher Lebensvorgänge beruht, sondern einfach auf der Anwesenheit der Narkotica schlechtweg, mit deren Entfernung sie, gleichviel ob an lebendem oder an leblosem Material, wieder rückgängig wird. Die als Nachwirkung der Narkose bei höheren Konzentrationen zu beobachtende Permeabilitätssteigerung, wie sie Versuch 67 Nr. 2 besonders deutlich zeigt, ebenso wie die bei hohen Chloroformkonzentrationen unmittelbar festzustellende Permeabilitätssteigerung (vgl. Versuch 59 und 60) ist dagegen vollkommen irreversibel und beruht mithin auf einer durch die Narkotica bewirkten Veränderung der Zellgrenzflächen, die nicht mehr rückgängig zu machen ist.

Dies legt den Gedanken nahe, daß es sich bei dieser Permeabilitätsverminderung einerseits und -steigerung andererseits um zwei ganz verschiedene Wirkungen handelt, die in keinem unmittelbaren Zusammenhange zu stehen brauchen, ja vielleicht sogar gleichzeitig nebeneinander bestehen können. Denn es erscheint nicht recht begreiflich, wieso gerade die Beseitigung des Narkoticums eine Steigerung der Permeabilität sollte hervorrufen können; dagegen könnte man sich unschwer vorstellen, daß die Narkotica durch ihre Einwirkung eine entsprechende Veränderung der Zellgrenzflächen herbeiführen, die aber durch die gleichzeitig und mittels eines anderen Mechanismus wirksame Permeabilitätsverminderung zunächst verdeckt wird und daher erst nach Aufhebung der letzteren zum Vorschein kommt. Zugunsten dieser Deutung scheint mir die Beobachtung zu sprechen, daß auch nach Aufhebung der Narkose mit einer an sich bereits die Permeabilität steigernden Chloroformkonzentration eine noch viel beträchtlichere Steigerung als Nachwirkung feststellbar ist, wie dies die Versuche 59 und 60 auf das deutlichste zeigen, so daß man den Eindruck hat, als wäre auch die permeabilitätssteigernde Wirkung hoher Konzentrationen noch mit einer durch die Anwesenheit des Narkoticums

bedingten Permeabilitätsverminderung kombiniert und könnte sich daher erst nach Beseitigung der letzteren in vollem Umfange äußern.

8. Theorie der Narkose.

Die Gesamtheit der Versuche ergibt eine vortreffliche und nunmehr völlig eindeutige Bestätigung und Ergänzung der Anschauungen, zu denen Lillie, Loewe, Höber, Mc Clendon auf Grund ihrer Versuche gelangt sind. In narkotischer, d. h. die Lebensfunktionen reversibel herabsetzender Konzentration bewirken die Narkotica eine reversible Verminderung der Permeabilität der Zellgrenzflächen, sowohl für Wasser wie für gelöste Bestandteile.

Mit dieser Erkenntnis scheint zweifellos die Grundlage für eine allgemeine Theorie der Narkose gewonnen. Das wesentlichste Kriterium der Narkose ist die reversible Herabsetzung der Erregbarkeit. Seit den Nernstschen Untersuchungen dürfen wir die Erkenntnis als gesichert ansehen, daß die Erregungsvorgänge mit Konzentrationsänderungen von Ionen an den Zellgrenzflächen in irgendwelchem Zusammenhange stehen, gleichviel, was für Vorstellungen man sich über das Zustandekommen derselben bilden mag. In Zusammenhang mit der von uns nachgewiesenen Verminderung der Wasserpermeabilität sei hier auf die interessanten Untersuchungen von Bethe[1]) verwiesen, der die Erregungsvorgänge neuerdings auf capillarelektrische Erscheinungen zurückzuführen sucht. Bei seinen Modellstudien konnte er beim Durchleiten elektrischer Ströme durch poröse Scheidewände außer Konzentrationsänderungen von Ionen auch Wasserbewegungen beobachten, deren primäre Erzeugung, wie sie bei mechanischen, osmotischen und vielleicht auch thermischen Einwirkungen stattfinden wird, umgekehrt auch Konzentrationsänderungen hervorrufen muß, die in einfacher Weise die Wirksamkeit dieser Art von Reizen erklären würden. Auf jeden Fall, auch bei Zugrundelegung andersartiger Vorstellungen wird die Durchgängigkeit für Wasser ebenso

[1]) A. Bethe, Capillarchemische (capillarelektrische) Vorgänge als Grundlage einer allgemeinen Erregungstheorie. Arch. f. d. ges. Physiol. 163, 147, 1916.

wie die für Ionen einen wichtigen Faktor der Erregbarkeit darstellen.

„Erklären" kann in der Naturwissenschaft nichts anderes bedeuten, als ein neues spezielles Problem auf ein älteres und allgemeineres zurückführen. In diesem Sinne ist es eine Erklärung der Narkose, wenn es gelungen ist, das spezielle Problem der narkotischen Herabsetzung der Erregbarkeit auf das allgemeine der Beziehungen zurückzuführen, die zwischen Erregbarkeit und Durchgängigkeit der Zellgrenzflächen überhaupt bestehen. Erst eine weitere Klärung dieser Beziehungen wird auch ein genaueres Eindringen in das Wesen der Narkose ermöglichen.

Es scheint eine ganz allgemeine Eigentümlichkeit der Narkotica zu sein, daß sie in ganz schwachen Konzentrationen eine Steigerung der Lebensfunktionen herbeiführen, für die noch keine befriedigende Erklärung gegeben wurde. Denn die Versuche, das Erregungsstadium der Narkose auf den Fortfall von Hemmungen zurückzuführen oder als nur „scheinbares" durch die Verlangsamung der Erregungsvorgänge zu erklären (Fr. W. Fröhlich), können, wie ich an anderer Stelle zeigen werde, zum mindesten in dieser Verallgemeinerung einer Kritik nicht standhalten.

Auf Grund der Beobachtung, daß leichter Sauerstoffmangel die Phagocytose anregt, während starker sie lähmt, hat kürzlich Hamburger[1]), unter Hinweis auf die analogen Erscheinungen am Atemzentrum, vom Standpunkte der Erstickungstheorie der Narkose aus das Erregungsstadium durch die Annahme zu erklären versucht, daß es durch die leichte Behinderung der Oxydationsprozesse bei Einwirkung schwacher Konzentrationen bedingt werde. Dieser Erklärungsversuch ist keineswegs, wie Hamburger annimmt, neu, sondern gerade im Hinblick auf die Erscheinungen der Sauerstoffmangeldyspnoe bereits vor Jahren von mir selbst gegeben worden[2]). Ganz ab-

---

[1]) H. J. Hamburger, Phagocyten und Atemzentrum. Erklärung des Excitationsstadiums bei der Narkose. Intern. Zeitschr. f. phys.-chem. Biol. 2, 249, 1915.

[2]) H. Winterstein, Wärmelähmung und Narkose. Zeitschr. f. allg. Physiol. 5, 347, 1905.

gesehen davon aber, daß ich in den vorangehenden Mitteilungen (I bis III) die Unhaltbarkeit der Erstickungstheorie der Narkose zur Genüge dargetan zu haben glaube, wird dieser Erklärungsversuch durch die einfache Tatsache widerlegt, daß die Oxydationsvorgänge selbst ein solches „Erregungsstadium“ aufweisen, indem schwache Konzentrationen der Narkotica eben keine Herabsetzung, sondern eine Steigerung derselben herbeiführen (Literaturangaben s. Mitteilung I[1]), die, wie ich für die Alkoholnarkose des Froschrückenmarks nachweisen konnte (Mitteilung II[2]), sogar noch bei Konzentrationen bestehen kann, die eine völlige Aufhebung der Erregbarkeit bewirken.

Vielleicht vermag auch hier die Feststellung der Permeabilitätsverminderung zu einem Verständnis dieser Erscheinung zu verhelfen. Wie schon in der Mitteilung III[3]) hervorgehoben, sprechen mancherlei Anzeichen, vor allem die gleichsinnigen Änderungen von Erregbarkeit und Intensität des Ruhestromes beim Froschrückenmark, für das Bestehen enger Beziehungen zwischen Erregbarkeit und Zellpolarisation. Führt man die letztere auf eine elektive Permeabilität der Zellgrenzflächen zurück, so könnte man sich wohl vorstellen, daß ein leichter Grad von Permeabilitätsverminderung, der den Durchgang der schwer permeierenden Ionen noch weiter verlangsamt, eine Erhöhung des Oberflächenpotentials bewirkt, während eine noch weiter gehende Permeabilitätsverringerung schließlich auch den leicht permeierenden Ionen den Weg versperrt und so das Potential wieder abschwächt.

Wie die reversible Permeabilitätsverminderung die reversiblen Erscheinungen der Narkose, so erklärt die irreversible Permeabilitätssteigerung, die wir bei hohen Konzentrationen wenigstens als Nachwirkung auftreten sehen, die irreversibel toxischen Wirkungen der Narkotica, deren Sonderung von den eigentlich narkotischen schon von verschiedenen Autoren, wenn auch ohne faßliche Grundlage, angenommen wurde.

---

[1]) Kritische Übersicht über die Beziehungen zwischen Narkose und Sauerstoffatmung. Diese Zeitschr. 51, 150, 1913.

[2]) Der Einfluß der Narkose auf den Gaswechsel des Froschrückenmarks. Diese Zeitschr. 61, 81, 1914.

[3]) Narkose und Erstickung. Diese Zeitschr. 70, 142, 1915.

Versuchen wir nun zu einem Verständnis der narkotischen Permeabilitätsänderungen zu gelangen, so erscheint hinsichtlich der Permeabilitätsverminderung der Umstand von ausschlaggebender Bedeutung, daß diese auch nach Koagulation des Muskeleiweißes, ja, wie Loewe (l. c.) gezeigt hat, auch an künstlichen Lipoidmembranen nachweisbar ist. Diese Tatsache beweist, wie schon erwähnt, daß es sich hier nicht um irgendwelche „vitalen" Prozesse, sondern um einen einfachen physikalisch-chemischen Vorgang handelt, der, da er auch an leblosem Material völlig reversibel ist, offenbar einfach auf der Anwesenheit des Narkoticums beruht. Berücksichtigt man, daß reversible Hemmungen chemischer Prozesse durch die Narkotica auch an völlig unorganisiertem Material zur Beobachtung kommen, wie dies vor allem die Untersuchungen Warburgs[1]) über die Hemmung der Oxalsäureverbrennung an Blutkohle und die Versuche Meyerhofs[2]) über Hemmung der Wasserstoffsuperoxydzersetzung des kolloidalen Platins dargetan haben, also unter Bedingungen, unter denen andere wie Adsorptionsvorgänge überhaupt nicht in Betracht kommen können, so ergibt sich als nächstliegende Schlußfolgerung, daß es die Adsorption der Narkotica an die Plasmahautkolloide ist, welche die Verringerung der Durchgängigkeit für Wasser und die in ihm gelösten Bestandteile herbeiführt.

In welchen Beziehungen steht nun diese Anschauungsweise zu der „Lipoidtheorie" der Narkose? Loewe (l. c.) hat durch seine Arbeiten wahrscheinlich gemacht, daß die sogenannte „Lipoidlöslichkeit" der Narkotica in Wahrheit auf Adsorptionserscheinungen beruht, und hat, gestützt hierauf sowie auf die von ihm erwiesene Verringerung der elektrischen Leitfähigkeit künstlicher Lipoidmembranen bei Zusatz von Narkoticis, ebenso wie früher auch Lillie (l. c.), wiederum lediglich die Lipoide zum Ausgangspunkt seiner eingehenden physikalisch-chemischen Deduktionen über den Mechanismus der Narkose gemacht. Die

---

[1]) O. Warburg, Über Verbrennung der Oxalsäure an Blutkohle und die Hemmung dieser Reaktion durch indifferente Narkotica. Arch. f. d. ges. Physiol. **155**, 547, 1914.

[2]) O. Meyerhof, Über Hemmung der Wasserstoffsuperoxydzersetzung des kolloidalen Platins durch indifferente Narkotica. Arch. f. d. ges. Physiol. **157**, 307, 1914.

neueren Untersuchungen haben uns aber gelehrt, daß bei unvoreingenommener Betrachtung nicht die geringste Veranlassung besteht, den Lipoiden eine ausschlaggebende Rolle bei den narkotischen Vorgängen zuzusprechen, wie dies seit den Arbeiten von Meyer und Overton für die meisten geradezu zu einer Art von Zwangsvorstellung geworden ist.

Das Fundament, auf dem die Lipoidtheorie ruht, ist der Parallelismus zwischen narkotischer Wirksamkeit und dem Teilungskoeffizienten zwischen Öl und Wasser. · Seitdem wir aber durch die Arbeiten Traubes in der Capillaraktivität einen Faktor kennen gelernt haben, der der Wirkungsstärke der Narkotica meist ebenso gut, oft weit besser parallel geht, wie der genannte Teilungskoeffizient, seitdem wir durch die Arbeiten von Warburg, Meyerhof, Batelli und Stern u. a. wissen, daß das Gesetz der homologen Reihen auch für die Gärungshemmung der Aceton-Dauerhefe, für die Ausflockung von Hefepreßsaft und von Nucleoproteiden, für die Hemmung von Enzymwirkungen und einfachen katalytischen Prozessen, also durchwegs auch unter Bedindungen gilt, unter denen Lipoide überhaupt gar nicht in Frage kommen, fehlt jede Berechtigung, den Lipoiden in ihrer Bedeutung für die Narkose eine Ausnahmestellung unter den übrigen Kolloiden der Plasmahaut einzuräumen. Durch die Lipoidtheorie glaubte man auf das glücklichste das Permeierungsvermögen der Narkotica einerseits und die Impermeabilität der Zelle für wasserlösliche Bestandteile andererseits erklären zu können. Der Nachweis, daß die Narkotica gerade die Permeabilität für Wasser und die in ihm gelösten Substanzen vermindern, zwingt, wie für die letzeren schon Lepeschkin (l. c.) hervorhob, zu der Schlußfolgerung, daß diese den gleichen Weg durch die Plasmamembran nehmen wie die Narkotica und liefert so ein Argument auch gegen die Heranziehung der Lipoide zur Erklärung der normalen Permeabilitätsverhältnisse.

Es bleibt schließlich noch die Erklärung der permeabilitätssteigernden Wirkung hoher Narkoticumdosen. Hier liegt es in der Tat nahe, ausgehend von der Extrahierbarkeit der Lipoide durch die Narkotica, auf die schon Bibra und Harless ihre Theorie der Narkose stützten, mit Höber (l. c.) an eine Lösungserscheinung an den Lipoiden der Plasmahaut

zu denken, um so mehr als nach lange fortgesetzter Narkose eine Zunahme des Fett- und Lecithingehaltes des Blutes beobachtet wurde[1]). Man könnte dann zu folgendem anschaulichen Gleichnis von der Wirkung der Narkotica gelangen: Man stelle sich die Plasmahaut, an deren elektive Durchgängigkeit die normalen Zellfunktionen geknüpft sein sollen, als ein Sieb vor; dann würden die Narkotica die Poren dieses Siebes verstopfen und so eine (nach ihrer Entfernung wieder vorübergehende) Verminderung der Durchgängigkeit und dadurch eine Herabsetzung bzw. Aufhebung der Erregbarkeit bewirken; andererseits aber würden die Narkotica die Eigentümlichkeit besitzen, in hohen Konzentrationen eine Grundsubstanz des Siebes aufzulösen und so eine irreversible Steigerung der Durchgängigkeit herbeiführen, die vor allem als Nachwirkung, nach Beseitigung der porenverstopfenden Stoffe zutage tritt. Auf diese Weise könnte den Lipoiden eine besondere Bedeutung zwar nicht für den eigentlichen Mechanismus der Narkose, wohl aber für die irreversibel toxischen Erscheinungen der Übernarkotisierung eingeräumt werden.

Es muß aber ausdrücklich hervorgehoben werden, daß wir auch hier keineswegs genötigt sind, die Lipoide zur Erklärung der Permeabilitätssteigerung heranzuziehen. Schon Lepeschkin (vgl. S. 77) hat die von ihm beobachtete Durchgängigkeitserhöhung bei starken Chloroformkonzentrationen auf eine Koagulation der Eiweißkörper der Plasmahaut und einen dadurch bedingten Verlust der elektiven Permeabilität zurückgeführt; Traube (vgl. S. 80) hat auf die Zunahme der elektrischen Leitfähigkeit bei Einwirkung der Narkotica in kolloidfällenden Konzentrationen hingewiesen; wir haben schließlich in unserer früher zitierten Arbeit (vgl. S. 83) den direkten Nachweis geführt, daß die Koagulation der Eiweißkörper durch Wärmewirkung oder beim Absterben einen Verlust der elektiven Permeabilität und eine starke Erhöhung der Salzdurchgängigkeit bewirkt. Da zahlreiche Untersuchungen der neueren Zeit uns die meist irreversible kolloid- (keineswegs bloß lipoid-) fällende Wirkung der Narkotica kennen gelehrt haben, die in

---

[1]) K. Reicher, Chemisch-experimentelle Studien zur Kenntnis der Narkose. Zeitschr. f. klin. Med. 5, 235, 1908.

der Tat durchwegs erst bei übernarkotischen Konzentrationen auftritt und daher auch nicht, wie dies verschiedentlich versucht wurde, für den Mechanismus der Narkose verantwortlich gemacht werden kann, so gibt die Verminderung des Dispersitätsgrades der Plasmahautkolloide eine völlig zureichende Erklärung der irreversiblen Permeabilitätssteigerung durch toxisch wirkende Narkoticumkonzentrationen, ohne daß die Lipoide hierbei eine besondere Rolle spielen müßten.

Alle sonstigen Wirkungen der Narkotica, wie besonders ihre antikatalytische Beeinflussung der verschiedenen Fermentprozesse, vor allem der Oxydationsvorgänge, dürften erst die sekundären Folgen ihrer Adsorption an den Zellgrenzflächen und den im Zellinneren wirksamen Zellstrukturen darstellen, wie überhaupt mit Lepeschkin[1]) darauf hingewiesen werden muß, daß die Schlüsse, zu denen wir über die der Untersuchung zunächst allein zugänglichen Eigenschaften der Zellgrenzflächen gelangen, zum Teil möglicherweise für die ganze Plasmamasse Geltung besitzen können. Aus diesem Grunde wurde mit Absicht in den vorangehenden Ausführungen stets der Ausdruck „Zellgrenzflächen“ gebraucht und die Bezeichnung „Membran“ im allgemeinen vermieden, weil diese eine Abgrenzung auch gegen das Zellinnere einbegreifen würde, über die wir, soweit die Wirkungen der Narkotica in Frage kommen, vorläufig nichts Bestimmtes aussagen können.

Zusammenfassend können wir die Theorie der Wirkung der Narkotica folgendermaßen formulieren: Die Adsorption der Narkotica an die Zellkolloide bewirkt eine reversible Verminderung der Durchgängigkeit der Zellgrenzflächen für Wasser und wasserlösliche Bestandteile, wodurch eine Herabsetzung bzw. Aufhebung der an die normalen Permeabilitätsverhältnisse geknüpften Erregbarkeit bedingt wird (reversible Narkose); in höheren Konzentrationen tritt als sekundäre Folge eine irreversible Permeabilitätssteigerung ein, die wahrscheinlich auf der Verminderung des Dispersitätsgrades der Zellkolloide beruht (irreversibel toxische Übernarkotisierung).

[1]) W. W. Lepeschkin, Zur Kenntnis der chemischen Zusammensetzung der Plasmamembran. Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 29, 247, 1911.

4. Zusammenfassung.

Eine kritische Übersicht über die Literatur ergibt, daß noch keine genügende Klarheit über die Beziehungen zwischen Narkose und Permeabilität geschaffen ist. Die in einer vorangehenden Arbeit beschriebene Methode der direkten Untersuchung der Wasser- und Salzdurchgängigkeit von Muskelmembranen ermöglicht eine endgültige Entscheidung dieser Frage.

Es ergibt sich, daß die Narkotica in narkotischer Konzentration eine hochgradige und völlig reversible Verminderung der Permeabilität für Wasser bewirken. Eine Permeabilitätsverminderung für Salze entzieht sich wegen der an sich sehr geringen Salzdurchgängigkeit der normalen Gewebe bei diesen dem Nachweis; sie ist jedoch gleichfalls direkt feststellbar an Muskelmembranen, die durch Abtötung ihre elektive Permeabilität eingebüßt haben. Auch hier ist die beobachtete Permeabilitätsverminderung vollkommen reversibel.

Bei hohen Narkoticumkonzentrationen tritt vor allem als Nachwirkung eine irreversible Durchgängigkeitserhöhung ein.

Diese Feststellungen ermöglichen eine allgemeine Theorie der Wirkungen der Narkotica, die sowohl die reversiblen narkotischen Lähmungen wie die irreversiblen toxischen Folgen der Übernarkotisierung befriedigend zu erklären vermag. Es besteht keine Veranlassung, den Lipoiden bei dem Mechanismus dieser Wirkungen eine ausschlaggebende Rolle zuzuteilen.

Physikalische und chemische Vorgänge im überlebenden Muskel als Ursache der Totenstarre[1].

Von

Leonhard Wacker.

(Aus dem pathologischen Institut der Universität München.)

(Eingegangen am 23. März 1916.)

Mit 3 Figuren im Text.

Im Muskel spielen sich gleich nach dem Tode und dem Aufhören der Blutzirkulation vorzugsweise drei ineinandergreifende, chemisch verfolgbare Veränderungen ab, die mit der physiologischen Tätigkeit in nahem Zusammenhange stehen. Diese Vorgänge sind Glykogenabbau, Säurebildung und Neutralisation der gebildeten Säure.

Diese Neutralisation ist durch die Zunahme der Acidität und Abnahme der Alkalescenz gekennzeichnet und hat als bemerkenswerte Erscheinungen noch eine Kohlensäureentbindung aus Alkalibicarbonat, die Zersetzung des Alkalialbuminats unter Abscheidung der eiweißartigen Komponente im Muskel und die postmortale Wärmebildung im Gefolge.

Da anzunehmen ist, daß sich die erwähnten Prozesse innerhalb der Muskelfaser vollziehen, werden dieselben die physikalischen Verhältnisse beeinflussen und zu jenem Zustande führen, den wir als Totenstarre bezeichnen.

Durch den Zerfall des großen kolloiden Glykogenmoleküls

---

[1]) Vgl. hierzu: L. Wacker, Zur Kenntnis der Totenstarre und der physiologischen Vorgänge im Muskel. Münch. med. Wochenschr. **1915**, Nr. 26, S. 874; Nr. 27, S. 913. — Anoxybiotische Vorgänge im Muskel. Arch. f. d. ges. Physiol. **163**, 491, 1916.

in kleinere Kristalloidmoleküle wird der osmotische Druck steigen, und die freiwerdende Kohlensäure, die durch das Blut nicht mehr abtransportiert werden kann, wird zur Druckerhöhung beitragen. Die Abscheidung des voluminösen, globulinartigen Eiweißkörpers wird dem Muskel eine gewisse Steifheit verleihen können, so daß also die Totenstarre auf einen Komplex von Ursachen zurückzuführen wäre.

Die Schwierigkeit, über den genetischen Zusammenhang der chemischen Vorgänge im absterbenden Muskel ein zuverlässiges Bild zu bekommen, liegt vorzugsweise an drei Umständen, die bei der Untersuchung berücksichtigt werden müssen.

Zunächst ist daran zu denken, daß man gleich nach dem Tode, wo doch sicherlich schon die Untersuchung einsetzen muß, keine stabilen Verhältnisse im Muskel vor sich hat, sondern der Glykogengehalt sowohl, als auch die Säuremenge ändern sich von Minute zu Minute. Das Glykogen nimmt fortwährend ab, die Säure dagegen zu. Solange der Organismus noch warm ist, vollziehen sich die Prozesse rasch. Entnimmt man beispielsweise einige Muskelproben für die Glykogenbestimmung, so haben sich während des Zeitverlustes durch die Wägung usw. die Proben für die Muskelreaktion schon so weit verändert, daß sie nicht mehr zu den Glykogenproben passen, da unterdessen die Säurebildung weiter fortgeschritten ist. Der Fehler wird vergrößert, weil die eine Substanz in der Abnahme, die andere in der Zunahme begriffen ist. Verfolgt man diese Verhältnisse an den beigegebenen Kurven (Fig. 1 u. 2), so wird man sich überzeugen, daß sich auf diese Weise grobe Fehler einschleichen können. Glykogenproben und Proben für Muskelreaktion müssen daher tunlichst rasch und gleichzeitig, ohne erhebliche Zerkleinerung, in heiße Lauge bzw. siedendes Wasser eingeführt werden[1]).

Ein weiterer, schwerwiegender Mißstand liegt in dem bekannten wechselnden Gehalt der Muskeln an Glykogen, der wahrscheinlich mit der funktionellen Beanspruchung im Zusammenhang steht. So ist z. B. ein großer Unterschied

[1]) Wenn ich mich nicht durchweg an die hier besprochenen Erfahrungen gehalten habe, so liegt dies daran, daß dieselben erst nach und nach gesammelt werden mußten.

im Glykogengehalt des M. sartorius (0,211 bis 0,473 %) und des M. quadriceps (0,587 bis 0,648 %) desselben Hundes. Die Schwankungen sind nicht nur bei verschiedenen Muskeln, sondern sogar innerhalb ein und desselben nicht unbedeutend. Um mich zu überzeugen, daß dies nicht an meiner Methode liegt, zerkleinerte ich ein einheitliches Stück Pferdemuskel, mischte die zerschnittenen Partien und fand dann ziemlich übereinstimmend 0,75 und 0,77 % Glykogen.

Wie aus dem verschiedenartigen Glykogengehalt eine Fehlerquelle entstehen kann, beleuchtet folgendes Beispiel (s. Tafel II, Hund 3, Serie 3): Würde man die Probe zur Glykogenbestimmung gleich nach dem Tode des Tieres nur vom Quadriceps entnommen haben, so hätte man als erste Unterlage für den Vorgang des Glykogenabbaus 0,077 und 0,032 % im Mittel 0,054 % Glykogen gefunden. Erfolgt dann die zweite Entnahme nach $6^1/_2$ Stunden und nach Eintritt der Totenstarre[1]) vom M. adductor magn., so würde sich ein Glykogengehalt von 0,045 % ergeben. Die scheinbare Glykogenabnahme betrüge also 0,054 — 0,045 = 0,009 %. Daraus wäre der Schluß berechtigt, daß kein Abbau stattgehabt hat. Tatsächlich aber betrug der Anfangsglykogengehalt des M. addukt. magn. 0,220 %, es sind somit 0,220 — 0,045 = 0,175 % und nicht 0,009 % abgebaut worden.

Wie ersichtlich, ist die Probeentnahme und die Auswahl der Versuchsobjekte von einschneidender Bedeutung. Ganz vermeiden werden sich Mißgriffe nicht lassen, schon weil die beiden Bestimmungen nicht in ein und derselben Probe durchführbar sind.

Bei höherem Glykogengehalt werden die Unterschiede in den gestapelten Mengen größer, und beim Abbau treten Selbststeuerungsmechanismen in Tätigkeit, die wahrscheinlich den Zweck haben, eine schädliche übermäßige Säureproduktion zu regulieren. Die verschiedenen abbauenden Fermente werden durch die anfallende Säure in verschiedener Weise gehemmt. Je nachdem Alkalescenz oder Acidität vorwiegt, werden Fermente aktiviert, die Säurebildung begünstigen oder verhindern. Der Dissimilationsprozeß bleibt unter Um-

---

[1]) Bei Mangel an Untersuchungsmaterial und kleinen Tieren (Tafel II, Versuch 1, 3. Serie).

Tafel

Verlauf des Glykogenabbaues und der

Serie	Versuch Nr.	Erste Entnahme: Zeit der Entnahme nach dem Tode	Glykogengehalt %	Mittlerer Glykogengehalt %	Alkalescenz in ccm $^{n}/_{10}$-Säure	Acidität in ccm $^{n}/_{10}$-Alkali	Albuminat-Eiweiß %	Zweite Entnahme: Zeit der Entnahme nach dem Tode	Glykogengehalt %	Mittlerer Glykogengehalt %	Alkalescenz in ccm $^{n}/_{10}$-Säure	Acidität in ccm $^{n}/_{10}$-Alkali	Albuminat-Eiweiß %	Dritte: Zeit der Entnahme nach dem Tode	Glykogengehalt %
Verlauf bei niedrigem und mittlerem															
1. Serie im Spätherbst	1	ca. 20 bis 30 Min.	0,322					4 St.	0,083					—	—
	3	„	0,236					„	0,051					20 St.	0,033
	4	„	0,254					„	0,055					„	0,021
	8	„	0,232					„	0,033					„	0,012
	5	„	0,232					„	0,006					11 St.	0,000
	6	„	0,260					6 St.	0,002					7³/₄ St.	0,000
	9	„	—		35,8	35,8		4 St.	—		15,3	56,6		24 St.	—
	10	„	—		37,0	40,7		„	—		12,1	64,4		„	—
2. Serie im Hochsommer	1	Sogleich nach dem Tode, d. h. gleichfalls 20 bis 30 Min. p. m.	0,187		40,0	37,1		2 St.	0,053		26,8	50,7			
	6		0,385 0,339 0,440 0,282	0,362	33,3	52,0								24 St.	0,036 0,046
3. Serie im Herbst und Winter	1	Sogleich nach dem Tode, d. h. gleichfalls 20 bis 30 Min. p. m.	0,226 0,383	0,304	40,0	53,3								24 St.	0,000 0,000
	2		0,244 0,245	0,244	49,3 41,3	42,6 50,7	0,80 0,42	5 St.	0,000 0,000	0,000	36,0 —	57,3 —	0,18 —	„	0,000 —
	3		0,207 0,259	0,233	38,7 40,0	46,7 46,7	0,36 —	5¹/₂ St.	0,000 —		25,3 25,3	61,3 61,3	0,05 —	„	0,000 —
	4	In Narkose intra vitam entnommen	0,383 0,365	0,374	52,0 52,0	38,7 40,0	0,98 —	5 St.	0,071 0,052	0,061	28,0 —	60,0 —	0,16 —	22 St.	0,000 —
	5		0,173[1] 0,293[2]	0,233	49,3 45,3	42,7 45,3	0,88 0,74	5¹/₂ St.	0,000 0,000	0,000	30,7 —	60,0 —	0,21 —		
Verlauf bei höherem Glykogen-															
4. Serie im Hochsommer	2	16 Min.	0,689		35,2	45,8		1 St. 22 Min.	0,440		10,6	70,4		2 St. 22 Min.	0,785
	3	45 Min.	0,516 0,600	0,558	16,7 —	56,0 —		1 St. 35 Min.	0,287		9,3 8,6	68,0 66,0			
	4	30 Min.	0,582 0,624 0,566 0,692	0,616	17,3 20,0	69,3 66,6		1 St. 8 Min.	0,430 0,440	0,435	16,0 10,6	66,6 64,0			
	5	10 Min.	0,639 0,381	0,510	36,0	46,6								2¹/₂ St. bei 37,5°	0,076 0,042

[1]) Vom M. quadriceps.
[2]) Vom M. addukt. magn.

I.

Säurebildung beim Kaninchen.

Entnahme				Vierte Entnahme						Bemerkungen
Mittlerer Glykogengehalt %	Alkalescenz in ccm n/10-Säure	Acidität in ccm n/10-Alkali	Albuminat-Eiweiß %	Zeit der Entnahme nach dem Tode	Glykogengehalt %	Mittlerer Glykogengehalt %	Alkalescenz in ccm n/10-Säure	Acidität in ccm n/10-Alkali	Albuminat-Eiweiß %	
Glykogengehalt der Muskeln.										
				44 St.	0,008					Vgl. Münch. med. Wochenschr. 1915 Tab. Ia.
				49 St.	0,009					
				52 St.	0,004					
				33 St.	0,004					
				—	—					4 Std. bei 37,5°.
				—	—					6 Std. bei 37,5°.
	12,8	57,3		48 St.			11,8	61,9		Hierzu keine Glykogenbestimmung.
	11,8	62,2		48 St.			8,3	63,3		
				31 St.			24,0	50,3		Lösung der Starre nach 31 St.
0,041	24,0	74,6								Lösung der Starre nach 30 St.
0,000	18,6	74,6		48 St.	0,000		18,6	74,6		Lösung nach 48 St.
	30,7 —	62,7 —	0,12 —	"	0,000 —		30,7 —	62,7 —	0,12 —	Beginn der Lösung nach 50 St.
	25,3 —	61,3 —	0,00 —	"	0,000 —		26,7 26,7	61,3 58,7	— —	Lösung nach 48 St.
	20,0 —	69,3 —	0,05 —							Durch Narkose getötet. Lösung nach 71 St.
				"	0,000 0,000	0,000	30,7 —	60,0 —	0,15 —	Durch Narkose getötet. Lösung nach 55 St. noch nicht erfolgt.
gehalt der Muskeln.										
	7,8	73,9		31 St.	0,231		7,5	64,3		Beginn der Lösung der Starre nach 31 St.
				"	0,000		9,3 —	68,0 —		
				"	0,102 0,123	0,112	9,3 —	77,3 —		
0,059	17,3	64,6								$2^1/_2$ St. im Brutschrank bei 37,5°.

Tafel

Verlauf des Glykogenabbaues und

	Versuch Nr.	Erste Entnahme						Zweite Entnahme						Dritte Entnahme					
		Zeit der Entnahme nach dem Tode	Glykogengehalt des Muskels %	Mittlerer Glykogengehalt %	Alkalescenz in ccm n/10-Säure pro 100 g Muskel	Acidität in ccm n/10-Alkali pro 100 g Muskel	Albuminat-Eiweiß %	Zeit der Entnahme nach dem Tode	Glykogengehalt des Muskels %	Mittlerer Glykogengehalt %	Alkalescenz in ccm n/10-Säure pro 100 g Muskel	Acidität in ccm n/10-Alkali pro 100 g Muskel	Albuminat-Eiweiß %	Zeit der Entnahme nach dem Tode	Glykogengehalt des Muskels %	Mittlerer Glykogengehalt %	Alkalescenz in ccm n/10-Säure pro 100 g Muskel	Acidität in ccm n/10-Alkali pro 100 g Muskel	Albuminat-Eiweiß %
1. Serie, Herbst	2	30 Min.	0,251	—	33,3	30,0	—												
2. Serie im Hochsommer	1	30 bis 55 Min.	0,255 [1]) 0,324 [2]) 0,427 [3])	0,335	29,3 29,3	36,6 36,6	— —	1 St. 40 Min. bis 1 St. 55 Min.	0,229 0,287 0,276	0,264	13,3 17,3	50,7 49,3	— —	3 St.	0,120 0,228	0,174	13,3	53,3	—
	2	26 Min.	0,648 [2]) 0,587 [2]) 0,544 [2]) 0,414 [2]) 0,473 [1]) 0,211 [1])	0,479	28,0 26,6	39,3 37,3													
	3	25 Min.	0,538 [4]) 0,380 [4]) 0,321 [4]) 0,400 [4]) 0,428 [4]) 0,281 [4])	0,391	32,0	33,3													
3. Serie im Winter	1	Während Narkose bis 20 Min. p. m.	2,094 [4]) 1,987 [4])	2,040	40,4 38,1	16,0 16,3	1,120 0,692												
	2	10 bis 30 Min.	0,530 [5]) 0,364 [2]) 0,331 [2])	0,408	45,3 46,7	28,0 26,7	1,246 —												
	3	In vivo während der Narkose	0,220 [5]) 0,077 [2]) 0,032 [2])	0,109	44,0 41,3	26,7 29,3	1,135 1,124												

[1]) M. Sartorius.
[2]) M. quadriceps.
[3]) M. biceps.
[4]) Quadriceps und Adduktoren-Gruppe.

II.

der Säurebildung im Hundemuskel.

Vierte Entnahme						Fünfte Entnahme						Sechste Entnahme						Bemerkungen
Zeit der Entnahme nach dem Tode	Glykogengehalt des Muskels %	Mittlerer Glykogengehalt %	Alkalescenz in ccm $^n/_{10}$-Säure pro 100 g Muskel	Acidität in ccm $^n/_{10}$-Alkali pro 100 g Muskel	Albuminat-Eiweiß %	Zeit der Entnahme nach dem Tode	Glykogengehalt des Muskels %	Mittlerer Glykogengehalt %	Alkalescenz in ccm $^n/_{10}$-Säure pro 100 g Muskel	Acidität in ccm $^n/_{10}$-Alkali pro 100 g Muskel	Albuminat-Eiweiß %	Zeit der Entnahme nach dem Tode	Glykogengehalt des Muskels %	Mittlerer Glykogengehalt %	Alkalescenz in ccm $^n/_{10}$-Säure pro 100 g Muskel	Acidität in ccm $^n/_{10}$-Alkali pro 100 g Muskel	Albuminat-Eiweiß %	
6 St.	0,181	—	21,7	41,7	—	24 St.	0,080	—	15,0	48,3	—	96 St.	0,004	—	13,3	50,0	—	Lösung d. Starre nach 96 St.[7])
6 bis 6½ St.	0,102	—	9,3	57,3	—	26 St.	0,120	—	8,0	58,0	—	49 St.	0,000 0,000	— —	4,0	86,6	—	Lösung d. Starre nach 48 St.
6½ St.	0,278 0,366	0,322	14,7	53,3		30 St.	0,263	—	13,3	53,3		48 St.	0,127 0,113	0,120	12,0	54,7		Lösung d. Starre nach 48 St.
6 St.	0,112[4]) 0,047[4])	0,079																Starre nach 32 St. vollkommen gelöst (jung. Tier). Versuchsanordnung ursprüngl. für anderweitige Beweisführung bestimmt.
5½ St.	2,141[4]) 2,094[4])	2,117	22,7	33,3	0,140							55 St.	1,150[3])					Lösung d. Starre nach 23 St. Kleiner jung. Hund, tags vorh. stark gefüttert. 1 St. lang in Äthernarkose, dann durch Chloroform getötet.
6½ St.	0,156[5]) 0,112[2]) 0,109[2])	0,125	20,0 20,0	49,3 53,3	0,100 —	48 St.	0,090[5]) 0,074[2]) 0,065[2])	0,076	17,3	56,0	0,042	78 St.	0,071 0,053	0,062 —				Lösung d. Starre nach 72 St.
6 St.	0,045[5]) 0,000[2]) 0,000[2])	0,015	28,0 18,7	42,7 53,3	0,593 0,109							48 St.	0,000[6]) 0,000[2])	0,000	21,3 18,7	54,7 56,0	0,160 0,107	Lösung d. Starre nach 80 St. 1 St. i. Äthernarkose, dann durch Chloroform getötet.

[5]) M. adduct. magn.

[6]) Adduktoren-Gruppe.

[7]) Sämtliche Tiere waren bei Versuchsantritt zirka 20 Stunden nüchtern.

Tafel III.

Chemische Vorgänge im absterbenden Kaninchenmuskel bei niedrigem Glykogengehalt vor und nach Eintritt der Totenstarre.

Versuch	Nr.	Veränderungen vom Tode bis zum Eintritt der Starre							Veränderungen vom Eintritt der Starre bis zur Lösung derselben							Bemerkungen
		Zeit der 2. Probenahme nach dem Tode	Abnahme des Glykogens %	Abnahme der Alkalescenz in ccm $^n/_{10}$-Säure pro 100 g Muskel	Abnahme der Alkalescenz berechnet in % Milchsäure	Zunahme der Acidität in ccm $^n/_{10}$-Alkali pro 100 g Muskel	Zunahme der Acidität berechnet in % Milchsäure	Menge des im Muskel abgeschied. Albuminat-Eiweißes %	Zeit der 3. Probenahme nach dem Tode	Abnahme des Glykogens %	Abnahme der Alkalescenz in ccm $^n/_{10}$-Säure pro 100 g Muskel	Abnahme der Alkalescenz berechnet in % Milchsäure	Zunahme der Acidität in ccm $^n/_{10}$-Alkali pro 100 g Muskel	Zunahme der Acidität berechnet in % Milchsäure	Menge des im Muskel abgeschied. Albuminat-Eiweißes %	
1. Serie im Spätherbst	1	4 St.	0,239						44 St.	0,075					—	Tiere durch Nackenschlag getötet. 1. Probe für Glykogenbestimmung 20 bis 30 Min. nach dem Tode entnommen. Muskelreaktion nicht festgestellt. (Siehe Münch. med. Wochenschr. 1915 a. a. O.)
	3	4 „	0,185						49 „	0,034					—	
	4	4 „	0,199						52 „	0,051					—	
	8	7 „	0,199						33 „	0,029					—	
	9	4 „	—	20,5	0,184	20,8	0,187	—	48 „	—	4,2	0,037	5,3	0,047	—	Tiere durch Nackenschlag getötet. 1. Probe für Muskelreaktion 20 bis 30 Min. nach dem Tode. Glykogengehalt nicht ermittelt.
	10	4 „	—	24,9	0,224	23,7	0,213	—	48 „	—	3,8	0,034	keine	keine[1])	—	
2. Serie i. Hochsommer	1	2 St.	0,134	13,2	0,118	13,6	0,122	—	31 St.	0,053	2,4	0,021	keine	keine[1])	—	1. Probe für Glykogenbestimmung rasch nach dem Tode, Proben für Muskelreaktion hinterher entnommen. Daher die niedrigen Alkalescenzabnahme-Zahlen. Tiere durch Nackenschlag getötet.
3. Serie im Herbst und Winter	2	5 St.	0,244	13,3	0,120	14,7	0,132	0,62	48 St.	0,000	5,3	0,047	5,4	0,048	0,06	
	3	$5^1/_2$ St.	0,207 0,259	13,4 14,7	0,120 0,132	14,6 14,6	0,131 0,131	0,31 —	48 „	0,000	keine	keine	keine	keine	0,05	
	4	5 St.	0,312 0,313	24,0	0,216	21,3	0,191	0,82	22 „	0,071 0,052	8,0	0,072	9,3	0,083	0,11	Die ersten Proben für Glykogen und Muskelreaktion während einer tiefen Äthernarkose exstirpiert. Hierauf die Tiere durch weitere Chloroformzufuhr getötet.
	5	$5^1/_2$ St.	0,173 0,293	18,6	0,167	17,3	0,156	0,67	48 „	0,000 0,000	keine	keine	keine	keine	0,06	
Mittelzahlen		—	0,229	17,8	0,160	17,6	0,158	0,60	—	0,033	3,4	0,030	2,8	0,025	0,07	

[1]) **Eine Abnahme der Alkalescenz ohne gleichzeitige Zunahme der Acidität ist nur denkbar, wenn sich im Muskel Albuminat-Eiweiß abscheidet. Die kleinen Differenzen können auf Versuchsfehler zurückgeführt werden.**

Tafel IV.

Chemische Vorgänge im absterbenden Hundemuskel vor und nach Eintritt der Totenstarre.

Versuch	Nr.	Veränderungen vom Tode bis zum Eintritt der Starre: Zeit der 2. Probenahme nach dem Tode	Abnahme des Glykogens %	Abnahme der Alkalescenz in ccm $^n/_{10}$-Säure pro 100 g Muskel	Abnahme der Alkalescenz berechnet in % Milchsäure	Zunahme der Acidität in ccm $^n/_{10}$-Alkali pro 100 g Muskel	Zunahme der Acidität berechnet in % Milchsäure	Menge des im Muskel abgeschied. Albuminat-Eiweißes %	Veränderungen vom Eintritt der Starre bis zur Lösung derselben: Zeit der 3. Probenahme nach dem Tode	Abnahme des Glykogens %	Abnahme der Alkalescenz in ccm $^n/_{10}$-Säure pro 100 g Muskel	Abnahme der Alkalescenz berechnet in % Milchsäure	Zunahme der Acidität in ccm $^n/_{10}$-Alkali pro 100 g Muskel	Zunahme der Acidität berechnet in % Milchsäure	Menge des im Muskel abgeschied. Albuminat-Eiweißes %	Bemerkungen
1. Serie	2	6 St.	0,070	11,6	0,104	11,7	0,105	—	96 St.	0,181	8,4	0,075	8,3	0,074	—	Tier durch Erschlagen getötet. 1. Probe für Glykogenbestimmung sogleich (30 Min.) nach dem Tode. Probe für Muskelreaktion erst ca. 20 Min. später. Siehe Tafel II.
2. Serie	1	6½ St.	0,236	20,0	0,180	20,7	0,186	—	49 St.	0,102	5,3	0,047	9,3	0,083	—	Zeit der 1. Probenahme für Glykogen aus Tafel II ersichtlich. 1. Probe für Muskelreaktion 60 bis 70 Min. p. m.
	2	6½ St.	0,157	13,3	0,119	14,0	0,126	—	48 „	0,202	2,7	0,024	1,4	0,012	—	Zeit der 1. Probenahme für Glykogen aus Tafel II ersichtlich. 1. Probe f. Muskelreakt. 39 Min. p. m.
3. Serie	2	6½ St.	0,283	25,3 26,7	0,236 0,240	21,3 26,6	0,191 0,239	1,146 —	48 St. 48 „	0,049	2,7 2,7	0,024 0,024	6,7 2,7	0,060 0,024	0,058 —	1. Probe für Glykogen und Reaktion gleichzeitig entnommen. Zeit aus Tafel II ersichtlich.
	3	6 St.	0,084	16,0 22,6	0,144 0,203	16,0 24,0	0,144 0,216	0,542 1,015	48 „ 48 „	0,115	6,7 0,0	0,060 0,000	12,0 2,7	0,108 0,024	0,433 0,002	Siehe Tafel II.
Mittelzahlen		—	0,166	19,4	0,175	19,1	0,172	0,901	—	0,109	4,0	0,036	6,1	0,055	0,164	

ständen bei Zwischenstufen stehen, es lassen sich Muskelzucker (Hexose)[1]) und eine Milchsäurevorstufe[2]) mit Sicherheit nachweisen.

Die übersichtlichen Resultate wurden deshalb an Muskeln von Kaninchen bei niedrigem Glykogengehalt erzielt, unter Bedingungen, bei denen die vorerwähnten Mißstände tunlichst ausgeschaltet waren.

Glykogenabbau[3]).

Meine Untersuchungen über den Glykogenabbau wurden in drei verschiedenen Zeitperioden ausgeführt, zwei davon fielen in die kühle Herbst- und kalte Winterzeit und eine in die Hitzeperiode des Hochsommers. Obwohl in der Ernährungsweise der Kaninchen keine wesentliche Änderung eintrat (sie wurden mit Heu und Hafer gefüttert, im Sommer mögen zuweilen einige Gemüseabfälle verwertet worden sein), zeigte sich im Glykogengehalt (mit einer einzigen Ausnahme) ein wesentlicher Unterschied:

Während der kühlen Jahreszeit enthielt die Muskulatur des Kaninchens im Mittel 0,26, selten über 0,35 % Glykogen, während in der Hitzeperiode des Hochsommers im Mittel 0,48 % bis zum Höchstwerte von 0,69 % festgestellt wurden.

Bei geringem Glykogengehalt (0,26 %) verschwindet dasselbe bis zum vollkommenen Eintritt der Totenstarre, d. h. innerhalb 5 bis 6 Stunden (Starreerscheinungen treten schon nach ca. 3 Stunden ein) nach dem Tode, vollkommen, und die Säurebildung erreicht damit oft schon ihr Maximum, manchmal wird aber noch etwas Säure nacherzeugt.

Ist mehr Glykogen zugegen (etwa 0,35 bis 0,40 %), so

---

[1]) I. Parnas u. R. Wagner, Diese Zeitschr. 61, 387, 1914.

[2]) G. Embden, F. Kalberlah u. H. Engel, Diese Zeitschr. 45, 5, 1912.

[3]) Zur Glykogenbestimmung: Es wurden auf einer gutziehenden Handwage jeweils 7 g Muskel genau abgewogen, in groben Stückchen in 30 ccm heiße, 60 %ige Kalilauge eingeführt und 3 Stunden im Wasserbad erhitzt. Zur Verdünnung wurden 30 ccm Wasser (inkl. Spülwasser) verwendet und das Glykogen mit 130 ccm 95 %igen Alkohols gefällt. Nach der Inversion wurde eine Filtration eingeschaltet und im übrigen nach Pflüger gravimetrisch verfahren. Siehe Handb. d. Biochem. Arbeitsmethoden 2, 164 u. 174.

bleiben nach Eintritt der Starre noch etwa 0,05 bis 0,1 °/₀ Glykogen übrig (Tafel I, Versuch 6, 2. Serie und Versuch 4, 3. Serie). Dieser Rest verschwindet dann im Verlaufe von 24 bis 48 Stunden unter mäßiger Zunahme der Säure.

Bei verhältnismäßig hohem Glykogengehalt (0,5 °/₀ und darüber) wurde in der Mehrzahl der Fälle das Glykogen während der Beobachtungszeit (bis zur Lösung der Starre) nicht vollkommen verbraucht (Versuche 2 u. 4, 4. Serie). Befördert kann die Wirkung des diastatischen Fermentes durch Wärmezufuhr (Versuche 5 u. 6, 1. Serie und 5, 2. Serie) werden.

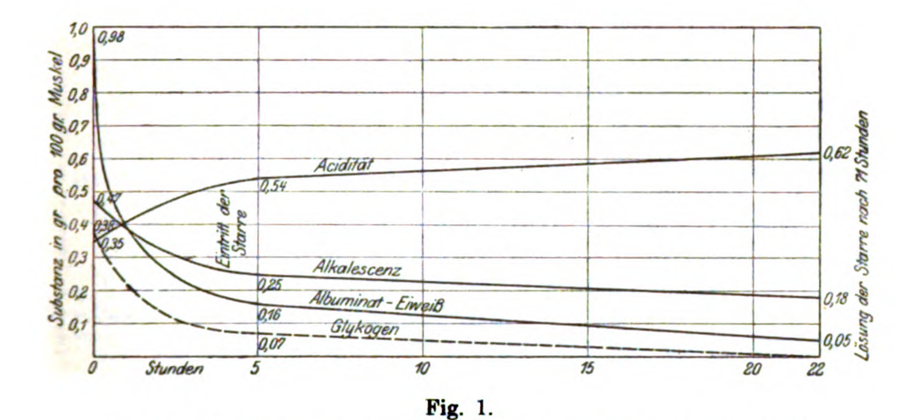


Fig. 1.

Chemische Vorgänge im absterbenden Kaninchenmuskel.
(Nach Versuch 4. 3. Serie, obere Reihe, Tafel I.)

Während die Totenstarre beim Kaninchen in der kalten Jahreszeit (trotzdem die Leichen in dem untertags geheizten Laboratorium lagen) 48 Stunden und länger anhielt, löste sich dieselbe im Hochsommer in der Regel schon nach 31 Stunden.

Beim roten Muskel des Hundes ist der Glykogenabbau vor Eintritt der Totenstarre ein trägerer als beim Kaninchen (s. Tafel III u. IV und Fig. 1 u. 2), das gleiche gilt noch in erhöhtem Maße für normale Individuen bei Pferd und Mensch. Bei letzteren Muskelgattungen findet man noch nach Eintritt der Totenstarre einen höheren Glykogengehalt (0,7 bis 0,8 °/₀), der lange Zeit hindurch ohne wesentliche Abnahme anhält.

Säurebildung.

Dem ganzen Verlauf der Säurebildung nach zu urteilen, muß man dieselbe als einen mit dem Glykogenabbau genetisch im Zusammenhang stehenden Prozeß auffassen (s. den Verlauf der Kurve Fig. 1 u. 2 und die Tafeln I u. II). Die Menge der entstehenden Säure entspricht zwar im Durchschnitt nicht der aus dem Glykogenschwund theoretisch zu erwartenden Quantität,

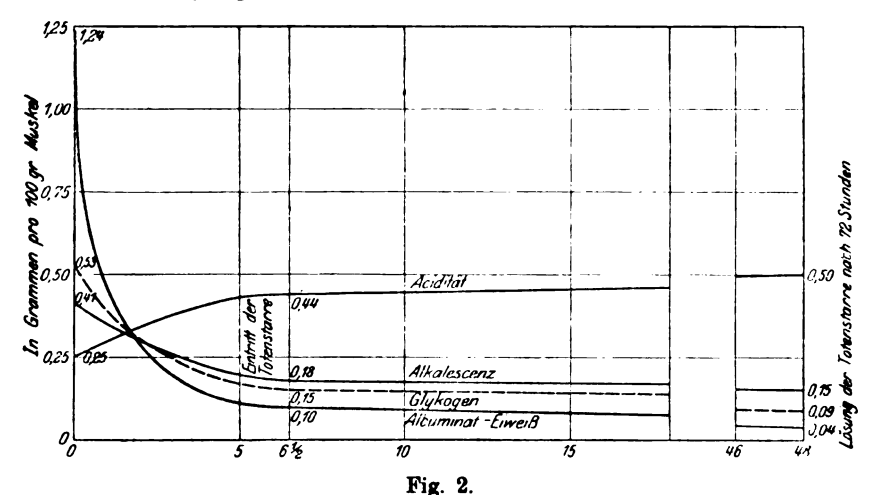


Fig. 2.
Chemische Vorgänge im absterbenden Hundemuskel.
(Nach Versuch 2. 3. Serie, obere Reihe, Tafel II.)

doch kommt dieselbe bei niedrigem Glykogengehalt und sachgemäßer Entnahme sehr nahe an die Theorie heran (Säure als Milchsäure berechnet). Meine Versuche zeigen insofern ein der Säurebildung ungünstiges Bild, weil zuerst die Glykogenproben und dann erst jene für die Muskelreaktion entnommen wurden. Die Gründe hierfür wurden bereits eingangs erörtert. Die Gesamtmenge an Säure, die der Muskel vom Moment des Todes an zu bilden vermag, ist begrenzt, sie beträgt beim Kaninchen im Mittel 0,18 g, beim Hunde 0,21 g, in Milchsäure umgerechnet. $^3/_4$ bis $^5/_6$ hiervon entstehen schon in der ersten Periode bis zum Starreeintritt, der Rest bildet sich erst nachher. (Vgl. Tabelle III u. IV, sowie VII u. VIII).

Wie erwähnt, entspricht die Säurebildung der Glykogenabnahme annähernd nur bei geringem Glykogengehalt, bei

höherem verschwindet mehr Glykogen, als die Säurezunahme theoretisch verlangt, es kommt zur Bildung von Zwischenprodukten. Wäre der Zerfall des Glykogens im letzteren Fall ein quantitativer, so müßte sich dies durch das Auftreten von freier Milchsäure kundgeben, da die vorhandenen alkalischen Salze nicht mehr zur Neutralisation ausreichen würden. Theoretisch entstehen aus 1 g Glykogen 1,097 g Milchsäure[1]). Wenn man beispielsweise einen Kaninchen-Muskel mit 0,6 $^0/_0$ Glykogengehalt unter Wärmezufuhr vollkommen abbaut, so wären daraus 0,65 $^0/_0$ Milchsäure zu erwarten. Die vorhandenen alkalischen Salze reichen aber im günstigen Falle nur zur Neutralisation von 0,3 g hin, der Rest (0,35 g) müßte dann als freie Säure zugegen sein und sich durch den sauren Geschmack zu erkennen geben. Dieser Fall tritt aber weder im lebenden, noch im absterbenden Muskel ein. Die freie Säure würde auf die Dauer die Gewebe schädigen, es kommt zu einem Stillstand der Säureproduktion, noch ehe der letzte Rest von Alkalescenz aufgebraucht ist. In meiner früheren Mitteilung[2]) sind die Mengen dieser Restalkalescenz (entsprechend 9,7 ccm $^n/_{10}$-Säure pro 100 g Muskel) angegeben.

Bei einem gewissen Säuregrad wird, besonders im roten Muskel, der Glykogenabbau wesentlich verzögert, ein hoher Glykogengehalt im Muskel einer Leiche mit ausgeprägter Totenstarre (mindestens 6 Stunden post mortem) fällt daher immer mit einer verhältnismäßig niedrigen Alkalescenz, (einem geringen Gehalt an Albuminaten), und beträchtlicher Acidität zusammen (Tafel V und Tafel VI Sekt. Nr. 13). Umgekehrt konnte bei der menschlichen Leiche (Sekt. Nr. 12 u. 26, obere Reihe, Tafel VI) ohne jeglichen Glykogengehalt des Quadriceps, im Stadium beginnender Lösung der Totenstarre (17 bis 23 Stunden p. m.), noch ein ziemlich hoher Alkalescenzgrad (und reichlicher Albuminatgehalt) nachgewiesen werden. Man kann daraus schließen, daß Säurebildung ohne Anwesenheit von Glykogen nicht möglich ist, und ferner, daß Glykogenabbau und Säureproduktion abhängig sind von einer gewissen Menge alkalischer

[1]) Münch. med. Wochenschr. a. a. O.
[2]) Münch. med. Wochenschr. a. a. O., Tafel III.

Substanzen, oder daß umgekehrt das diastatische Ferment durch Säure inaktiviert[1]) wird.

Man darf sich die Umwandlung des Glykogens in Milchsäure natürlich nicht als einen einzigen Prozeß[2]) vorstellen; sie geschieht wahrscheinlich unter Mithilfe verschiedenartiger Fermente von verschiedenen Eigenschaften, die eine Selbststeuerung des Abbaues gewährleisten. Es würden demnach zunächst dextrin- und maltoseartige Kohlehydrate entstehen können, dann Hexose selbst (Muskelzucker)[3]) und später als Vorstufe der Milchsäure Dioxyaceton oder Glycerinaldehyd[4]). Bei allen diesen Zwischenstufen kann der Prozeß aussetzen und können sich größere Mengen anhäufen[5]). Die Umlagerung des Glycerinaldehyds zur Milchsäure könnte beispielsweise abhängig sein von der Gegenwart von Alkalibicarbonat[6]). Daß sich neutrale chemische Verbindungen unter dem Einfluß von Alkalien zu Säuren umgruppieren können, ist eine bekannte Tatsache, es sei nur an die Entstehung von Benzilsäure aus Benzil erinnert:

$$C_6H_5CO - CO - C_6H_5 + NaOH = \begin{matrix} C_6H_5 \\ C_6H_5 \end{matrix} > C(OH)COONa.$$

In der Tat befördert ein Zusatz von Natriumbicarbonat zum Muskelpreßsaft die Bildung von Milchsäure aus dem hypothetischen Lactacidogen Embdens (a. a. O.).

Man hat die Frage des Ursprungs der Milchsäure aus Kohlehydrat vielfach lediglich von den quantitativen Entstehungsverhältnissen abhängig gemacht, dabei aber weder die im vorstehenden besprochenen Abbaustufen, bei welchen der Prozeß stehen bleiben kann, berücksichtigt, noch der vorherrschenden Theorie, daß das Kohlehydrat im Muskel zu Kohlensäure verbrannt wird, Rechnung getragen. Was berechtigt zu der Annahme, daß die Dissimilation bei der Milch-

---

[1]) Kura Kondo, diese Zeitschr. **45**, 76, 1912.

[2]) Vgl. Carl Neuberg, Zuckerumsatz der Zelle. Handb. d. Biochem. v. Oppenheimer, Ergänzungsband **1913**, 569.

[3]) I. Parnas und R. Wagner a. a. O.

[4]) E. Buchner und Meisenheimer, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **43**, 1773, 1910. — G. Embden, F. Kalberlah und H. Engel a. a. O. — K. Kondo a. a. O.

[5]) v. Fürth, diese Zeitschr. **69**, 201, 1915.

[6]) M. Oppenheimer, diese Zeitschr. **45**, 134, 1912. — C. Neuberg, diese Zeitschr. **49**, 502, 1913.

säurestufe quantitativ halt machen soll, nachdem es doch Tatsache ist, daß im Muskel freie Kohlensäure auftritt, die man als ein Verbrennungsprodukt der Milchsäure angesehen hat? Die Milchsäure wird mit gleich großer Wahrscheinlichkeit eine Zwischenstufe des Abbaues des Glykogens zu Kohlensäure bzw. Alkalibicarbonat sein, wie der Muskelzucker und das Lactacidogen.

Der Nachweis der Anhäufung größerer Mengen von Milchsäure als Abbauprodukt des Glykogens im absterbenden Muskel würde in erster Linie für die Richtigkeit der Anschauung jener Physiologen sprechen, die annehmen, daß die Milchsäure größtenteils außerhalb des Muskels verbrannt wird, mit anderen Worten, daß die Kraftleistung im Muskel sich auf anoxybiotischem Wege vollzieht. Tatsächlich deuten aber alle Verhältnisse darauf hin, daß der Kohlehydratabbau im Muskel schon bei der Milchsäurestufe aussetzt, denn kaum ein anderer Vorgang ist so sichergestellt als das Verschwinden von Glykogen im Muskel bei Arbeit und Kälte unter gleichzeitigem Auftreten von Milchsäure im Muskel und Blute. **Das Vorhandensein von freier Kohlensäure im Muskel erklärt sich ohne Schwierigkeit aus der Neutralisation der Milchsäure durch das Bicarbonat des Blutes**[1]**.** So ist also die Annahme berechtigt, daß die direkte Kraftquelle des Muskels in anoxybiotischen Prozessen zu suchen ist.

Bekanntlich kommt auch in den anderen Organen, nicht nur im Muskel, eine postmortale Säurebildung zustande. Durch den Glykogengehalt ist dies für die Leber ohne weiteres verständlich. Über den Umfang derselben habe ich am Hunde Versuche angestellt, die in der folgenden Zusammenstellung wiedergegeben sind.

Auch hier kommt es nicht zur Bildung von freier Säure, es ist immer noch eine Restalkalescenz zugegen.

Im allgemeinen wurde die Beobachtung gemacht, daß die Summe von Alkalescenz und Acidität in den Organen niedriger

---

[1]) Vgl. Anoxybiotische Vorgänge im Muskel im Arch. f. d. ges. Physiol. 1916 a. a. O.

Postmortale Säurebildung in der Hundeleber.

Zeit der Entnahme in Std. und Min. nach dem Tode	Glykogengehalt in %	Alkalescenz in ccm $^{n}/_{10}$-Säure	Acidität in ccm $^{n}/_{10}$-Alkali	Bemerkungen
1 Std. 15 Min.	0,553	26,7	29,3	
6½ Std.	0,170	20,0	37,3	
25 „	0,104	13,3	53,3	
54 „	0,080	—	—	Verwesung.

ist als in den Muskeln. Dies gilt auch für obige Leber. Während sie im zugehörigen Muskel durchweg 67,3 betrug, war sie in der frischen Leber nur 56. In der Kaninchenniere sind die Unterschiede größer — Acidität und Alkalescenz waren = 55,1, während die Muskeln desselben Tieres 90,7 zeigten. Das Alkalescenzdepot der Organzellen scheint demnach niedriger zu sein als jenes des Muskels, besonders da die Muskelfasern der zahlreichen Blutgefäße der Organe noch eine Erhöhung verursachen dürften.

Neutralisation[1]).

Die in vivo, sowie postmortal im Muskel entstehende Säure wird neutralisiert. Man kann dies aber nicht als einen Neutralisationsprozeß im richtigen Sinne des Wortes bezeichnen, d. h. nicht als einen Zusammentritt äquivalenter Mengen von Säure und Base unter Wasseraustritt und Formation eines Neutralsalzes, sondern die basischen Salze im Muskel (Dialkaliphosphate) werden durch eine unzureichende Menge von Milchsäure in saure Salze (Monoalkaliphosphate) unter Bildung von Natriumlactat übergeführt. In allen bis jetzt beobachteten Fällen bleibt noch ein kleiner Rest von alkalischen Salzen (pro 100 g Muskel entsprechend 10 bis 15 ccm $^{n}/_{10}$-Säure), die sog. Restalkalescenz, zurück. Der Nachweis der Milchsäure im Muskel durch Titration ist also nur ein indirekter.

Die physiologische Bedeutung der Retention auffallend großer Mengen von Kaliumphosphaten im Muskel wird dadurch erklärlich. Des Zusammenhanges wegen füge ich hier eine

[1]) Vgl. Arch. f. d. ges. Physiol. **1916** a. a. O.

Analyse[1]) der Aschenbestandteile des Muskels der Säugetiere bei, woraus der hohe Phosphatgehalt ersichtlich ist:

K	2,54 bis 3,98 %	Mg	0,21 bis 0,30 %
Na	0,65 bis 1,56 %	P	1,70 bis 2,53 %
Fe	0,04 bis 0,24 %	Cl	0,40 bis 0,81 %
Ca	0,02 bis 0,18 %	S	1,86 bis 2,27 %

Außer den Alkaliphosphaten befinden sich im Muskel noch Alkalibicarbonate[2]) und Alkalialbuminate, die gleichfalls von der Milchsäure zersetzt werden. Dadurch werden die Verhältnisse komplizierter, es wird Kohlensäuregas frei und die unlösliche Eiweißkomponente der löslichen Albuminate schlägt sich innerhalb der Muskelfasern nieder.

Kohlensäure-Entbindung im Muskel als Folgeerscheinung eines Neutralisationsprozesses.

Ich glaube früher auf Grund experimenteller Belege (a. a. O.) den Nachweis erbracht zu haben, daß das Auftreten[3]) von freier Kohlensäure im Muskel noch kein Beweis für den vollkommenen Abbau des Kohlehydrats bis zu dieser Endstufe jeder Verbrennung in diesem selbst ist. Das Vorhandensein der Kohlensäure im Muskel ist mit größerer Wahrscheinlichkeit auf die Neutralisation der Milchsäure durch das Bicarbonat des Muskels und des Blutes zurückzuführen. Es wurde weiter hervorgehoben, daß sich das Natrium im Muskel unter Abstoßung der Kohlensäure mit Milchsäure verbindet. Der größte Teil des gebildeten Lactats verbrennt außerhalb des Muskels[4]) zu Natriumbicarbonat

---

[1]) Katz, Arch. f. d. ges. Physiol. **63**, 1, 1896.

[2]) Man kann sich vorstellen, daß im Muskel Natriumbicarbonat neben Monokaliumphosphat räumlich getrennt existiert. Bei der Extraktion des frischen Muskels mit heißem Wasser würde dann unter CO_2-Entwickelung Kaliumnatriumphosphat gebildet.

[3]) Fletcher, Journ. of Physiol. **23**, 54, 1898. — Weitere Literatur siehe bei M. v. Frey in Nagels Handb. d. Physiol. **4**, 475, 1909.

[4]) Es soll hiermit natürlich nicht gesagt sein, daß den Geweben kein Oxydationsvermögen zukommt. Auch der Muskel wird Lactat zu Bicarbonat verbrennen können, aber das Blut ist hierzu besonders befähigt. Vgl. z. B. A. Harden und H. Maclean, The oxydation of isolated animal tissues. Journ. of Physiol. **43**, 34, 1911. Ich hoffe, auf diesen Punkt mit Rücksicht auf die Publikationen von Pflüger und

und kehrt als solches wiederum in den Muskel zurück, so daß man gewissermaßen von einem Kreislauf des Alkalis sprechen kann. Hieraus geht hervor, daß das Endprodukt der Kohlehydratverbrennung im Organismus nicht freie Kohlensäure, sondern Alkalibicarbonat ist, entstanden durch Oxydation des Lactats. Kohlensäure wird aus dem Bicarbonat erst bei der Arbeit unter dem Einflusse von Milchsäure in Freiheit gesetzt. Durch das Bicarbonat regeneriert sich die Alkalescenz des Muskels nach Säuerung oder Ermüdung, indem das Monoalkaliphosphat wieder in Dialkaliphosphat übergeht, das abgeschiedene Albuminateiweiß wieder als Alkalisalz in Lösung gebracht und Bicarbonat als solches deponiert wird. Quantitativ verläuft die Kohlensäure-Entbindung analog dem Alkalescenzrückgang, der Wärmebildung[1]), dem Glykogenabbau und, wie wir später sehen werden, auch der Abnahme des Albuminateiweißes im wäßrigen Muskelextrakt (s. Kurven Fig. I u. II und Arch. f. d. ges. Physiol. a. a. O., Fig. 2). Welche bedeutende Rolle dieser raschen Kohlensäure-Entbindung bei Entfaltung der Muskelkraft möglicherweise zukommen könnte, wurde schon früher an anderem Orte besprochen und darauf hingewiesen, daß die von Hermann am isolierten absterbenden Muskel ohne Sauerstoffzufuhr beobachtete Kohlensäureabgabe beim Zustandekommen der Totenstarre nicht ignoriert werden kann.

Abscheidung der eiweißartigen Komponente[2]) (Globulin) der Alkalialbuminate mit fortschreitender Säurebildung im Muskel.

Wenn man den frischen Muskel mit heißem Wasser auskocht, so beobachtet man ein Aufschäumen (CO_2), und es gehen neben den Phosphaten usw. die in demselben vorhandenen Albuminate, d. h. Verbindungen der globulinartigen Eiweiß-

---

Stintzing (Arch. f. d. ges. Physiol. 18, 1878), sowie der engl. Autoren Fletcher, Hopkins, Hill usw. später eingehend zurückkommen zu können.

[1]) A. V. Hill, Journ. of Physiol. 44, 501, 1912.

[2]) Dieser Eiweißkörper wird in den Tabellen und dem folgenden Text mit dem allerdings nicht sehr wohlklingenden Namen „Albuminateiweiß" bezeichnet, um seine Herkunft aus den Albuminaten zu erkennen.

körper mit Alkalien, in Lösung. Je weiter aber der Säurebildungsprozeß fortschreitet, desto geringer wird das Aufschäumen und die Menge der vom Wasser aufgenommenen Albuminate. Bestimmt man in diesem wäßrigen Extrakt die Alkalescenz durch Titration mit $^{n}/_{10}$-Milch- oder Schwefelsäure bis zur eben schwach sauren Reaktion, so zerlegen sich die vorhandenen Albuminate unter Abscheidung eines dicken, voluminösen Niederschlags von Albuminateiweiß. Wenn man diese Eiweißniederschläge der verschiedenen Extrakte wägt, so findet man, daß sie mit fortschreitender Säuerung des Muskels rasch an Gewicht abnehmen. Die im absterbenden Muskel entstehende Säure zersetzt die vorhandenen Albuminate und verhindert dadurch die Extraktion. Das ausgefallene Albuminateiweiß bleibt im Muskel liegen.

Die quantitative Bestimmung geht Hand in Hand mit der Feststellung der Muskelreaktion, die eingehaltene Methodik soll daher nochmals kurz besprochen werden:

Der fettfreie Muskel wird in Stückchen von der Größe einer großen Haselnuß zerschnitten, und auf einer gut ziehenden Handwage werden 15 g genau abgewogen. Bei ganz frischem Muskel ist rasches Arbeiten notwendig. Nach der Wägung werden die Muskelstückchen möglichst rasch in 50 ccm bereit gehaltenes, kochendes Wasser eingetragen und 15 Minuten lang in leichtem Sieden erhalten. Alsdann filtriert man durch ein Faltenfilter von ca. 12 bis 14 cm Durchmesser und kocht den Rückstand nochmals mit 50 ccm heißem Wasser 15 Minuten lang, um abermals durch dasselbe Filterchen zu filtrieren. Hierauf werden die Muskelstückchen auf einem Holzteller fein zerschnitten, nochmals mit 50 ccm heißem Wasser 15 Minuten lang gekocht, wieder durch das gleiche Filterchen filtriert und schließlich der Prozeß mit 30 ccm Wasser wiederholt. Das Filter wird zum Schluß mit heißem Wasser nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate werden gemischt und in 2 Hälften geteilt. Die erste dient unter Zuhilfenahme dreier Tropfen einer $1^{0}/_{0}$igen alkohol. Phenolphthaleinlösung als Indicator zur Bestimmung der Acidität mit $^{n}/_{10}$-Alkali, die andere Hälfte unter Verwendung von 7 Tropfen einer ca. $^{1}/_{2}{}^{0}/_{0}$igen gesättigten alkoholischen Methylrotlösung[1]) zur Ermittlung der Alkalescenz unter Verwendung von $^{n}/_{10}$-SO_4H_2 oder Milchsäure. Als Farbumschlag ist eine Nuance maßgebend, die 1,4 ccm $^{n}/_{10}$-SO_4H_2 in 5 ccm einer $1^{0}/_{0}$igen Dinatriumphosphatlösung (M. G. 358,4), die in 95 ccm destilliertem Wasser verteilt und mit 7 Tropfen Methylrotlösung versetzt sind, hervorbringen. Die anfänglich kanariengelbe Lösung wird rosenrot.

---

[1]) Münch. med. Wochenschr. 1915 a. a. O.

Die Nuance des Farbumschlages der ersten Auskochung dient als Unterlage für die Einstellung und Titrierung der späteren Proben. Der im ersten Extrakt befindliche Albuminat-Eiweißniederschlag erschwert den Vergleich, man benützt daher zur Einstellung vorteilhafter das Filtrat. Der Eiweißniederschlag entsteht erst gegen Ende der Titration, wenn die Farbe von gelborange in rosenrot umschlägt. Zur quantitativen Bestimmung wird derselbe durch ein getrocknetes, vorher gewogenes Filter filtriert und nach dem Auswaschen mit Wasser, Alkohol (zur Entfernung des Farbstoffes) und Trocknen bei 105° das Gewicht in üblicher Weise festgestellt. Da man vorher in zwei Hälften geteilt hat, muß das gefundene Gewicht für 15 g Muskel natürlich verdoppelt werden.

Die gefundenen Mengen sind aus den beigegebenen Tabellen und Kurven zu ersehen. Der frische Hundemuskel enthält bis zu 1,24 %, der Kaninchenmuskel bis zu 0,98 % Albuminateiweiß in Form von Albuminaten. Die Gesamtmenge des im Kaninchenmuskel abgeschiedenen Albuminateiweißes beträgt im Mittel 0,67 %, wovon 0,60 % schon bis zum Eintritt der Starre abgeschieden werden. Beim Hund sind die Mengen größer, sie betragen 1,06 bzw. 0,90 g pro 100 Muskel (siehe Tafel VII und VIII).

Eine verhältnismäßig geringe Milchsäuremenge vermag (Fig. 1 u. 2) große Eiweißmengen abzuscheiden; ein Beweis dafür, daß das Eiweißmolekül sehr groß ist. Theoretisch besteht die Möglichkeit, hieraus die Größe des Eiweißmoleküls festzustellen. *Die Menge des aus dem Muskel in Form von Albuminat extrahierbaren Eiweißes ist abhängig von der Alkalescenz*, wie sich aus der folgenden Zusammenstellung beim Kanin-

Alkalescenz pro 100 g Muskel ausgedrückt in n/10-Säure	Albuminateiweiß in %	Mittelzahlen	Acidität pro 100 g Muskel ausgedrückt in n/10-Alkali	Mittelzahlen	Bemerkungen
52,0	0,98	0,98	38,7	38,7	Menge des bis zum Eintritt der Starre als Albuminat extrahierbaren Eiweißes 0,67 %
49,3	{0,88 0,80	0,84	{42,7 42,6	42,6	
45,3	0,74	0,74	45,3	45,3	
41,3	0,42	0,42	50,7	50,7	
38,7	0,36	0,36	46,7	46,7	
36,0	0,18	0,18	57,3	57,3	Menge des vom Eintritt der Starre bis zur Lösung derselben als Albuminat extrahierbaren Eiweißes 0,12 %
30,7	{0,21 0,15 0,12	0,16	{60,0 60,0 62,7	60,9	
28,0	0,16	0,16	60,0	60,0	
25,3	0,05	0,05	61,3	61,3	
20,0	0,05	0,05	69,3	69,3	

chen ergibt. Kleine Abweichungen in der Reihenfolge sind eher auf Titrationsfehler als auf Wägefehler zurückzuführen.

Diese Abscheidung eines voluminösen Eiweißkörpers ist ein weiterer Faktor in dem Komplex von Erscheinungen, die die Totenstarre bedingen.

Der Beweis, daß dieses Albuminateiweiß durch die Säurebildung im Muskel in unlöslicher Form abgeschieden bzw. durch die Alkalescenz in Lösung gehalten wird, läßt sich direkt in anderer Weise erbringen:

Pferdemuskel, dessen Glykogengehalt gleichzeitig ermittelt wurde, wird fein zerschnitten, gemischt, um ein gleichmäßiges Untersuchungsobjekt zu haben, und 3 Proben à 15 g abgewogen.

Man extrahiert

die 1. Probe 3mal mit je 50 ccm Wasser, letzteres wird kalt zugesetzt und schließlich 15 Minuten lang gekocht und filtriert;

die 2. Probe das erste Mal mit 45 ccm Wasser und Zusatz von 5 ccm $^n/_{10}$-Natriumbicarbonatlösung und alsdann 2mal mit 50 ccm Wasser wie bei der ersten Probe;

die 3. Probe 1mal mit 46 ccm Wasser und Zusatz von 4 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure, sodann 2mal mit je 50 ccm Wasser wie oben.

In den Extrakten wird Alkalescenz, Acidität und Albuminateiweiß in angegebener Weise bestimmt. Die Resultate zweier derartiger Versuchsreihen sind aus der folgenden Zusammenstellung zu ersehen:

Tafel V.

Art des Versuches	Alkalescenz in ccm $^n/_{10}$-Säure pro 100 g Muskel	Albuminateiweiß %	Acidität in ccm $^n/_{10}$-Alkali pro 100 g Muskel	Glykogen %
Pferdemuskelextrakt ohne Zusatz 41 St. p. m. .	20,0	0,10	44,0	0,628
Pferdemuskelextrakt + 5 ccm $^n/_{10}$-$NaHCO_3$ pro 15 g Muskel . .	46,7 44,0	0,72 nicht gewogen	29,3 26,7	—
Pferdemuskelextrakt + 4 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure pro 15 g Muskel .	6,7 8,0	nicht vorhanden nicht vorhanden	60,0 60,0	—

Wie ersichtlich, verursacht der Bicarbonatzusatz eine Zunahme, der Milchsäurezusatz dagegen das vollständige Verschwinden des Albuminateiweißes im Extrakt.

Auch an der menschlichen Leiche läßt sich konstatieren, daß der Albuminatgehalt des Muskelextraktes abhängig ist von der Alkalescenz:

Tafel VI.

Sekt.-Nr. u. Todesursache	Name des Muskels	Alkalescenz in ccm $^n/_{10}$ pro 100 g Muskel	Acidität in ccm $^n/_{10}$ pro 100 g Muskel	Albuminateiweiß in %	Glykogen %	Bemerkungen
Sekt. Nr. 26 (1916) Pylorus-Stenose. Tabes dorsalis. Allgem. Kachexie .	M. rectus femoris	34,7	30,7	0,760	Nicht vorhanden	32 St. p. m. noch leichte Totenstarre vorhanden
	M. vastus intermedius	22,7	42,7	0,232	0,016	
Sekt. Nr. 12 (1916) Zustand nach Nephrektomie . . .	M. rectus femoris	32,0	37,3	0,616	Nicht vorhanden	17 St. p. m. Totenstarre in Lösung begriffen
Sekt. Nr. 13 (1916) Suicid	M. rectus femoris	25,3	46,7	0,304	0,590 0,667	34 St. p. m. kräftige Totenstarre

Eigenschaften des Albuminateiweißkörpers. Physiologische Bedeutung der Albuminate. Reversible chemische Reaktionen. Albuminurien nach Überanstrengung und Stauungen. Orthostatische Albuminurie.

Das aus dem Muskelextrakt durch Säure gefällte Albuminateiweiß ist sehr voluminös. In diesem äußerst fein verteilten Zustande löst es sich in verdünnten ätzenden Alkalien, in Alkalicarbonat, Bicarbonat und Dialkaliphosphat, ev. beim Erwärmen, auf. Die Lösungen besitzen eine leichte kolloide Trübung, ähnlich den Glykogenlösungen. Aus denselben wird es durch verdünnte Mineralsäuren und organische Säuren, wie Milchsäure oder Essigsäure, gefällt. In einem Überschuß von Säure löst es sich leicht wieder auf und flockt dann beim Kochen nicht aus. Durch starke 25%ige Salpetersäure wird der Eiweißkörper gefällt, er liefert demgemäß in alkalischer Lösung auch die Ringprobe mit konzentrierter Salpetersäure. Ferner wird er durch das Eiweißreagens „Essigsäure + Ferrocyankalium“, sowie Esbachsches Reagens, niedergeschlagen. Er gibt also die typischen Eiweißreaktionen und unterscheidet sich nur im Verhalten gegen

verdünnte Säuren. Die Lösung in Alkalibicarbonat ist durch viel Ammonsulfat beim Erwärmen fällbar.

Wie erwähnt, beträgt die größte durch Extraktion beobachtete Menge im ganz frischen Muskel 0,98 bis 1,246 $^0/_0$ beim Kaninchen bzw. Hunde. Bei einem Trockengehalt des Muskels von ca. 25 $^0/_0$ würde dies beim Kaninchen rund 4 $^0/_0$ und beim Hunde 5 $^0/_0$ entsprechen.

Freie Milchsäure würde zweifellos das Gewebe empfindlich schädigen, im Muskel sind deshalb Vorkehrungen getroffen, um der Entstehung derselben vorzubeugen. In dieser Wirkung als Säureschutzmittel liegt unter anderem die physiologische Bedeutung der Alkalialbuminate. Sie zerlegen sich unter dem Einfluß der Milchsäure in Alkalilactat und Albuminateiweiß und haben in dieser Hinsicht eine dem Bicarbonat und Dialkaliphosphat analoge Funktion. Bei dem Neutralisationsprozeß wird zunächst aus dem Bicarbonat Kohlensäure in Freiheit gesetzt. Ist der Vorrat an Alkalibicarbonat erschöpft, so kommt das Dialkaliphosphat und zum Schluß erst das Alkalialbuminat an die Reihe. Die erwähnte Reihenfolge läßt sich chemisch beweisen: Monoalkaliphosphat zersetzt Natriumbicarbonat in wäßriger Lösung rasch unter Kohlensäureentwicklung, es kann also, ohne räumlich getrennt zu sein, nicht neben Bicarbonat existieren. Bei der Einwirkung von Milchsäure auf ein Gemisch von Dialkaliphosphat und Alkalibicarbonat wird zunächst CO_2 entweichen müssen, ehe das Diphosphat in Monophosphat übergeführt werden kann. Läßt man eine warme Lösung des Albuminateiweißkörpers in Dikaliumphosphat einige Stunden in der Kälte stehen, so wird wieder Albuminateiweiß abgeschieden. Zusatz von Mononatriumphosphat beschleunigt den Vorgang. In der Wärme löst sich der Niederschlag wieder. Die Umsetzung von Albuminateiweiß und Dialkaliphosphat bzw. Alkalialbuminat und Monoalkaliphosphat ist je nach Temperatur und Mengenverhältnissen umkehrbar. Aus diesem Grunde fällt bei der Titration der Muskelextrakte mit $^n/_{10}$-Säure das Albuminateiweiß immer erst zum Schlusse der Titration aus, wenn der größte Teil des Dialkaliphosphats in Monoverbindung umgesetzt ist.

Dem Ineinandergreifen dieser Prozesse scheint im rbeitenden Muskel bei der Neutralisation, der Re-

generation der Alkalescenz (Erholung) und der Regulierung des Kohlensäuregasdruckes eine Bedeutung zuzukommen. Ein Überdruck kann verhängnis voll werden, da die feinen Membranen gesprengt werden können. Eine automatische Druckregulation ist daher von Wichtigkeit, denn die Abfuhr der Kohlensäure durch das Blut kann nicht plötzlich erfolgen. Wenn wir uns den Kohlensäuredruck als Energiequelle zur Arbeitsleistung denken, so sind dazu Regulationsmechanismen erforderlich[1]). Es sei daher daran erinnert, daß die Zersetzung des Alkalibicarbonats durch das Monoalkaliphosphat ein reversibler Prozeß ist. Wird aus Bicarbonat unter der Einwirkung von Milchsäure Kohlensäure in Freiheit gesetzt und der Druck steigt zu hoch, so kann das vorhandene Dialkaliphosphat einen Teil der Kohlensäure unter Bildung von Bicarbonat und Monoalkaliphosphat aufnehmen, dadurch wird der Überdruck beseitigt. Wenn aber bei weiterer Beanspruchung des Muskels noch mehr Milchsäure neutralisiert werden muß, so wird schließlich das gesamte Dialkaliphosphat in Monophosphat umgesetzt sein, und eine Druckregulationswirkung fällt fort. Zu diesem Zeitpunkte kann das Alkalialbuminat[2]) als Regulator einspringen. Diese Substanz wird bei einem gewissen Kohlensäuredruck in Bicarbonat und Albuminateiweiß zerlegt. Hier liegt ein weiterer umkehrbarer Prozeß vor, denn das Bicarbonat vermag das Albuminateiweiß beim Nachlassen des Druckes wieder unter Regeneration von Alkalialbuminat und CO_2-Entbindung aufzulösen. Inzwischen hat das saure Monoalkaliphosphat seine hemmende Wirkung auf die verschiedenen Fermente ausgeübt. Das diastatische Ferment des Glykogenabbaues und die Enzyme, die die Zerlegung der Zwischenstufen zu Milchsäure besorgen, sind inaktiviert, d. h. es ist der Ermüdungszustand eingetreten. Eine wesentliche Säureproduktion ist nicht mehr zu erwarten. Aber immerhin scheinen auch jetzt noch Abwehrmaßregeln gegen die Bildung

[1]) Vgl. Arch. f. d. ges. Physiol. **1916** a. a. O.

[2]) Man nimmt an, daß den Albuminaten auch im Blute eine Druckregulationswirkung zukommt. Literatur hierzu siehe in Abderhaldens Lehrbuch d. physiol. Chem. 3. Aufl., S. 971/72.

freier Milchsäure notwendig zu sein. Das Albuminateiweiß besitzt den Charakter einer Säure und Base gleichzeitig. Es löst sich sowohl in Bicarbonat als auch in Milchsäure und nimmt dadurch letzterem unter Salzbildung den sauren Charakter. Es ist möglich, daß diese Milchsäureeiweißverbindung in das Blut[1]) abgeführt werden kann. Diese Abfuhr würde das letzte Hilfsmittel des Muskels darstellen, um sich vor Übersäuerung zu schützen. Anzeichen für die Richtigkeit dieser Anschauung besitzen wir in dem Erscheinen von Eiweiß im Urin bei übermäßiger Muskelanstrengung und nach kalten Bädern. Danach müßte der Eiweißkörper des Urins die Eigenschaft des Albuminateiweißes aus dem Muskel besitzen und z. B. durch Essigsäure gefällt werden, um sich im Überschuß wieder aufzulösen usw. Soweit die Literatur[2]). hierüber Aufschluß gibt, ist dies in der Tat der Fall. Nach L. Jehle[3]) ist die orthostatische Albuminurie als ein Symptom eines statischen Mißverhältnisses zwischen Wachstum und Körperkraft aufzufassen. Auch in diesem Falle ist die Annahme einer Muskelüberanstrengung, die zu erheblicher Säurebildung führt, berechtigt. Bekanntlich sind Zirkulationsstörungen und Stauungen durch Säurebildung charakterisiert. In allen diesen Beispielen könnte es zur Ausfuhr des Albuminateiweißkörpers kommen, der als Fremdkörper im Blute durch die Nieren beseitigt wird.

Postmortale Wärmebildung.

Der Beweis für einen Neutralisationsvorgang im Muskel ließ sich im Vorangegangenen mit ziemlicher Sicherheit in verschiedener Weise erbringen. Da jeder derartige Prozeß exothermisch verläuft, mußte sich auch in diesem Falle, wenn meine Schlüsse und Ausführungen richtig waren, die zugehörige

[1]) A. Pugliese, diese Zeitschr. 32, 16, 1911. Die experimentellen Befunde des Autors wären unter diesen Gesichtspunkten nachzuprüfen.

[2]) Vgl. v. Noordens Handb. d. Pathologie in d. Stoffwechsel. 2. Aufl. 1, 388, 1906. Dort auch Literaturangaben — L. Langstein, Berl. klin. Wochenschr. 1907, 98.

[3]) L. Jehle, Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheilkunde 12, 902, 1913.

Wärmeproduktion nachweisen lassen. Diese Annahme bestätigt sich; wir stoßen hier auf eine altbekannte Tatsache, nur die Erklärung des ursächlichen Zusammenhanges läßt sich auf diese Weise genauer präzisieren. Bei der menschlichen Leiche hat man vielfach gleich nach dem Tode eine Wärmebildung beobachtet, besonders dann, wenn der Tod unter starken Muskelkrämpfen, wie z. B. beim Tetanus, erfolgt war. Die Steigerung war in solchen Fällen, verursacht durch die großen Mengen neutralisierter und verbrannter Milchsäure, bedeutend, und Temperaturen bis zu 45,37° wurden festgestellt. Auch bei gewaltsam getöteten Hunden fand Heidenhain einen vorübergehenden Anstieg als eine konstante Erscheinung. Dagegen war nach chronisch und langsam verlaufenden, mit Kachexie einhergehenden Erkrankungen eine solche postmortale Zunahme der Temperatur nicht wahrnehmbar. Dieser Befund stand im Widerspruch zur Annahme, daß man es hier mit einer Allgemeinerscheinung zu tun hat.

Es ist das Verdienst Niederkorns[1]), diese Verhältnisse dahin geklärt zu haben, daß auch in solchen Fällen, wie z. B. nach Lungenschwindsucht eine mäßige Wärmebildung in der Leiche auftritt. Da sie jedoch gering ist, kann sie sich nicht in einer nachweisbaren Temperatursteigerung äußern, sondern die anfallende Wärme wird schon verbraucht, um den Wärmeverlust der Leiche zu decken. Die Temperatur der Leiche bleibt in einem solchen Falle eine gewisse Zeit hindurch unverändert, oder sie nimmt nur ganz schwach ab. Der Übersichtlichkeit wegen gebe ich die von Niederkorn stammende graphische Darstellung des Temperaturverlaufes

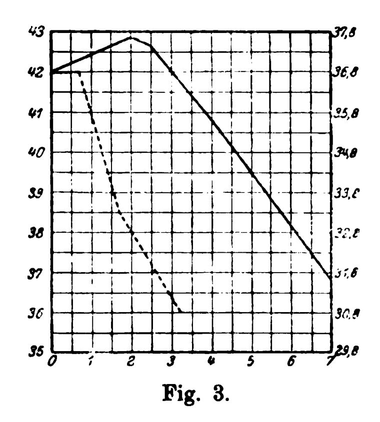


Fig. 3.

—— Temperaturkurve nach dem Tode bei Typhus. (Temperatur im Diagramm links angegeben.)
----- Temperaturkurve nach dem Tode bei Lungenschwindsucht. (Temperatur ist rechts angegeben.)

[1]) Zitiert nach Tigerstedt, Lehrb. d. Physiol. d. M. 1, 482.

nach dem Tode bei Typhus und Lungenschwindsucht in vorstehender Fig. 3 wieder:

Die geringe Wärmebildung bei Tuberkulose deckt sich mit meinen experimentellen Befunden[1]). Es ließ sich in einem solchen Falle 10 Stunden nach dem Tode kein Glykogen im M. quadriceps nachweisen. Vermutlich war die Säurebildung und Neutralisation auf ein Minimum reduziert, folglich kam es auch in der Zeitperiode von 9 bis 14 Stunden nach dem Tode zu keinen Starreerscheinungen. Die Quantität der produzierten Wärme ist demnach bis zu einem gewissen Grade ein Maßstab für die Intensität der Starre. Die Wärmemenge ist abhängig von der Quantität der neutralisierten Milchsäure und läßt sich daraus berechnen[2]). Wurden z. B. beim Kaninchen vom Tode bis zum Eintritt der Starre 0,160 g Milchsäure (Tafel VII) neutralisiert, so entspricht dies pro 100 g Muskel einer momentanen Wärmebildung von 24,3 Cal.

Bei einer spezifischen Wärme des Muskels von 0,825 bedeutet dies einen Temperaturanstieg von 0,29 Centigraden, die sich nach Maßgabe des Verlaufs der Alkalescenz-Abnahmekurve auf den Zeitraum von 5 Stunden verteilen. Wahrscheinlich erfährt die postmortale Wärmebildung durch anderweitige Prozesse noch eine Steigerung.

Schließlich sei hier noch auf die Tatsache hingewiesen, daß im überlebenden Muskel, sowie beim Eintritt der Chloroform- und Wärmestarre Milchsäurebildung, Kohlensäureentbindung und Wärmeproduktion bei Abschluß von Sauerstoff streng parallel gehen. Die calorimetrischen Messungen Hills[3]) bestätigen also meine Ausführungen, während die Versuche Peters[4]) auf analoge Verhältnisse beim arbeitenden Muskel hinzeigen. Wenn aber Hill die alleinige Ursache der Wärmebildung in thermochemischen Vorgängen und speziell im Übergang eines nicht der Kohlehydratreihe angehörigen Stoffes in Milchsäure sieht, so befindet er sich mit meinen Ergebnissen im Widerspruch. Nach Peters bildet ein bis zur Ermüdung gereizter Frosch-

---

[1]) Münch. med. Wochenschr. **1915** a. a. O.

[2]) Vgl. Arch. f. d. ges. Physiol. **1916** a. a. O.

[3]) A. V. Hill, Journ. of Physiol. **44**, 466, 1912; **46**, 1, 1913.

[4]) Peters, Journ. of Physiol. **47**, 243, 1913/14.

muskel pro 1 g Muskel 0,9 Cal. Der Neutralisation von 0,1 g Milchsäure pro 100 g Muskel entsprechen nach meiner Berechnung 15,1 Cal. Die berechnete Wärmemenge bleibt demnach wesentlich hinter der experimentell gefundenen zurück, denn es ist nicht anzunehmen, daß bei der Reizung des Froschmuskels pro 100 g 0,6 g Milchsäure entstehen können, sondern die durchschnittliche Säuremenge beträgt 0,216 % mit einer Höchstausbeute von 0,28 %[1]). Auf der Suche nach dieser Wärmequelle denken Hill und Peters lediglich an die Neutralisation der Milchsäure durch Bicarbonat und stoßen daher auf viel zu geringe Wärmemengen. Dies ändert sich natürlich, wenn man sich der Tatsache bewußt ist, daß die gesamte, beim normalen Kohlehydratabbau entstehende Milchsäure nicht nur durch Bicarbonat, sondern auch durch Dialkaliphosphat und Alkalialbuminat neutralisiert wird. Aber auch dann ist die experimentell festgestellte Wärmeproduktion noch annähernd doppelt so groß als der Neutralisationswärme entspricht. Nehmen wir z. B. an, es seien im Froschmuskel bis zum Stadium der Ermüdung 0,25 % Glykogen abgebaut worden, so entspricht dies bei einer theoretischen Milchsäureausbeute von 109,7 % 0,274 g Milchsäure. Diese Säuremenge würde eine Neutralisationswärme von $\frac{15{,}1 \times 0{,}274}{0{,}1} = 41{,}37$ Cal. produzieren.

Beim Abbau des Glykogens zur Milchsäure werden nach früheren Berechnungen[2]) pro 1 g Glykogen 174,5 Cal. frei, d. h. pro 0,25 g Milchsäure 43,62 Cal. Die Gesamtwärme wäre also $41{,}37 + 43{,}62 = 84{,}99$ Cal. Diese Zahl käme der experimentell gefundenen (90 Cal.) näher, aber es bleibt dann noch die Frage zu beantworten, wie groß die Energiemenge ist, die in Arbeit umgesetzt wurde, und welchen Ursprungs sie ist.

Schluß.

Die bei diesen Untersuchungen erhaltenen Resultate lassen sich am besten in Form der folgenden tabellarischen Übersicht wiedergeben:

---

[1]) s. Peters a. a. O. S. 266.

[2]) Münch. med. Wochenschr. 1915 a. a. O.

Tabelle VII.

Veränderungen im Kaninchenmuskel vor und nach dem Eintritt der Totenstarre. (Durchschnittszahlen.)

Art der Veränderung	Gesamtmenge pro 100 g Muskel in g	Veränderungen bis z. Eintritt der Starre in g pro 100 g Muskel	Veränderungen vom Eintritt der Starre bis zur Lösung in g pro 100 g Muskel	Veränderungen vor Eintritt der Starre, i. % d. Gesamtmenge	Veränderungen nach Eintritt der Starre bis z. Lösung i. % d. Gesamtmenge	Veränderungen bis z. Eintritt d. Starre, die Veränderungen nach dem Eintritt = 1 gesetzt
Glykogen-Abbau . .	0,262	0,229	0,033	87,4	12,5	7,0 : 1
Alkalescenzabnahme, ausgedrückt i. Milchsäure	0,190	0,160	0,030	84,1	15,8	5,3 : 1
Säurezunahme, ausgedrückt in Milchsäure	0,183	0,158	0,025	86,3	13,6	6,3 : 1
Albuminat-Abscheidung im Muskel . .	0,67	0,60	0,07	89,5	10,4	8,6 : 1

Tabelle VIII.

Veränderungen im Hundemuskel vor u. nach dem Eintritt der Totenstarre. (Durchschnittszahlen.)

Art der Veränderung	Gesamtmenge pro 100 g Muskel in g	Veränderungen bis z. Eintritt der Starre in g pro 100 g Muskel	Veränderungen vom Eintritt der Starre bis zur Lösung in g pro 100 g Muskel	Veränderungen bis z. Eintritt der Starre, i. % d. Gesamtmenge	Veränderungen nach Eintritt der Starre bis z. Lösung i. % d. Gesamtmenge	Veränderungen bis z. Eintritt d. Starre, die Veränderungen nach dem Eintritt = 1 gesetzt
Glykogen-Abbau . .	0,275	0,166	0,109	60,3	39,6	1,5 : 1
Alkalescenzabnahme, als Milchsäure berechnet	0,211	0,175	0,036	82,9	17,0	4,8 : 1
Säurezunahme als Milchsäure berechn.	0,227	0,172	0,055	75,7	24,2	3,1 : 1
Abscheidung von Albuminat-Eiweiß im Muskel	1,065	0,901	0,164	84,6	15,4	5,4 : 1

Zusammenfassend können wir sagen:

I. Mit Bezug auf die Totenstarre:

1. Die nach dem Tode im Muskel stattfindenden chemischen Vorgänge: Glykogenabbau, Säurebildung und Neutralisation der Säure verlaufen der Hauptsache nach innerhalb 5 bis 6 Stunden nach dem Tode.

2. Die Totenstarre tritt während des Ablaufs dieser Prozesse ein und ist als eine Folgeerscheinung derselben aufzufassen.

3. Bei der Neutralisation der Säure wird Dialkaliphosphat in Monophosphat übergeführt, aus Bicarbonat wird Kohlensäure freigemacht und aus dem Alkalialbuminat ein Eiweißkörper abgeschieden.

4. Als Ursache der Totenstarre können die folgenden physikalischen Erscheinungen angesehen werden:

a) Eine Steigerung des osmotischen Druckes innerhalb der Muskelfasern als Folge der Zertrümmerung des großen Kolloidmoleküls „Glykogen“ in zahlreiche Moleküle der Kristalloidsubstanz „Milchsäure“.

b) Eine Drucksteigerung durch Entbindung von Kohlensäuregas aus Bicarbonat.

c) Abscheidung eines Eiweißkörpers bei der Zersetzung von Alkalialbuminat durch Säure.

5. Die postmortale Wärmebildung ist die notwendige Folge des Neutralisationsvorganges, weil jede Neutralisation exothermisch verläuft.

II. Bezüglich der physiologischen Vorgänge im Muskel:

1. Die Menge der im Muskel gebildeten Säure ist abhängig von der Alkalescenz. Beim Sauerwerden wird wahrscheinlich durch Selbststeuerung weitere Säurebildung verhindert und der Glykogenabbau verzögert.

2. Das Auftreten freier Milchsäure wird durch die Anwesenheit von Alkalibicarbonat, Dialkaliphosphat und Alkalialbuminat (= Alkalescenz) unter Bildung von Alkalilactat verhindert.

3. Das Endprodukt der Verbrennung der Kohlehydrate im Organismus ist nicht Kohlensäure, sondern Alkalibicarbonat, entstanden durch Oxydation des Alkalilactats. Kohlensäure entsteht erst durch Einwirkung von Milchsäure auf das Bicarbonat.

4. Bei der Erholung wird die Alkalescenz des Muskels durch das Alkalibicarbonat des Blutes wieder

hergestellt; das Bicarbonat wird durch Verbrennung von Alkalilactat regeneriert.

5. Die Alkalien des Muskels können gleichzeitig als automatische Regulatoren des Kohlensäuredruckes funktionieren.

5. Zur Druckregulation sind folgende zwei chemisch reversible Prozesse geeignet:

a) $K_2HPO_4 + CO_2 + H_2O = KH_2PO_4 + KHCO_3$.

b) Alb[1] $Na + CO_2 + H_2O = Alb\ H + NaHCO_3$.

7. Der bei Überanstrengung des Muskels und bei orthostatischer Albuminurie im Harn ausgeschiedene Eiweißkörper besitzt ähnliche Eigenschaften wie die Albuminat — Eiweißkomponente des Muskels.

---

[1]) Alb = Eiweißkomponente der Albuminate.

Chemischer Bau und pharmakologische Wirksamkeit in der Digitalisgruppe.

Von

Walther Straub.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 25. März 1916.)

Mit 4 Figuren im Text.

Die chemische Konstitution der Glykoside der Digitalisreihe ist noch nicht aufgeklärt, das in anderen pharmakologischen Gruppen so emsig beackerte Land der Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Wirksamkeit hier kaum erst erschlossen.

Digitalisglykoside sind Zuckeräther; die für die einzelnen Glykoside spezifischen Zucker sind entsprechend ihrer einfacheren Zusammensetzung und der hohen Entwicklung der Zuckerchemie viel genauer bekannt wie die anderen Paarlinge dieser Äther, die sogen. Genine. Die spezifischen Zucker sind nun aber pharmakologisch ohne Interesse, da sie unwirksam sind; die Genine stellten bisher der Konstitutionsermittlung die allergrößten Schwierigkeiten entgegen. Soweit sie rein dargestellt wurden, schien die Prüfung am Tier ihre Unwirksamkeit zu ergeben, so daß im allgemeinen die Meinung besteht, die Digitalissubstanzen sind wirksame Additionsprodukte zweier unwirksamer Paarlinge.

Allerdings ist dieses Dogma seit nicht so kurzer Zeit schon ins Wanken geraten, erstmals als Hedbom unter Boehm[1]) die Wirksamkeit des Genins von Antiarin und Gröber[2]) diejenige des Strophanthin-Genins des Strophanthidins unzweifelhaft feststellten.

---

[1]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **45**, 242, 1901.

[2]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **72**, 395, 1913.

Der Nachweis der Wirksamkeit des Strophanthidins hat nun in neuester Zeit in hohem Maße an Bedeutung zugenommen, da es Windaus[1]) und seinem Schüler Hermanns gelungen ist, die Identität des Cymangenins mit Strophanthidin nachzuweisen und einige Konstitutionsänderungen der Seitenkette des Strophanthidinmoleküls festzulegen.

Die vorliegende Untersuchung befaßt sich erstens mit der kritischen Prüfung der Wirksamkeit der Genine und zweitens speziell mit der Beeinflussung der Wirksamkeit durch die von Windaus und Hermanns durchgeführten chemischen Änderungen am Strophanthidinmolekül. Die zur Untersuchung benutzten Reinsubstanzen wurden mir teils von Prof. Kiliani, teils von Prof. Windaus freundlichst zur Verfügung gestellt.

Als Zeichen der Wirksamkeit wurde ausschließlich die bekannte Wirkung auf den Ventrikel des Froschherzens benutzt; sie ist in ihrem Maximum als tonischer (systolischer) Stillstand an intaktem Frosch scharf festzustellen und in allen Graden ihrer Entwicklung am ausgeschnittenen Herzen unter graphischer Registrierung leicht zu verfolgen. Die zur Herbeiführung gleicher Wirkungsintensitäten nötigen Mengen der Substanzen stehen zum Vergleich. Zur Ermittlung der Wirksamkeit am ganzen Tier wurde keine der Zeitmethoden benutzt, sondern die von Houghton[2]) zur Wertbestimmung von Digitalispräparaten ausgearbeitete Methode der überhaupt tödlichen kleinsten Dosen. Dabei wurden die gewogenen Tiere serienweise mit steigenden Mengen der Substanzen vom Lymphsack aus vergiftet und als Titerwert das Mittel aus der eben noch wirksamen und eben nicht mehr wirksamen Menge der Substanz pro Gramm Frosch festgestellt. In diesem Sinne ist z. B. die absolut tödliche Minimaldosis für K-Strophanthin und männliche Temporarien, die allein verwendet wurden, vom Oktober bis Mai scharf = 0,00000075 g pro Gramm Frosch.

In besonderen, anderweitig zu veröffentlichenden Untersuchungen habe ich ermittelt, daß diese Werte der zeitlosen Methode der Messung sehr scharf sind. Aus Vergiftungsintensitäten, die nur wenig unterhalb des Grenzwertes sind, erholen sich die Tiere von selbst wieder, aus Grenz-

---

[1]) A. Windaus u. L. Hermanns: Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 48, 979 u. 991, 1915.

[2]) Journ. Americ. med. Assoc. 1898.

wertdosen nicht mehr. Es ist zu bedenken, daß mit Erreichung des maximalen tonischen Zustandes der Kreislauf aufhört und damit die äußere Möglichkeit der Erholung fortfällt. Prinzipiell ist die Erholbarkeit noch vorhanden, denn schneidet man das Herz aus und bringt es an eine Durchspülungsvorrichtung, so kann man es wieder zum Schlagen bringen, wenn auch ein Rest von Digitaliswirkung auf diesem Wege nicht zu entfernen ist. Die sonst viel benutzte Einstundenmethode von Lyons und Famulener[1]), bei der die Menge der in genau 60 Minuten tödlichen Dosis als Norm gewählt ist, gibt natürlich höhere Werte und zwar durchschnittlich um 25%. Diese Einstunden-Zeitmethode ist also schon fast eine zeitlose Methode. Je kürzer die Wirkungszeiten gewählt werden, desto höher und unzuverlässiger, mit Subjektivem verunreinigt fallen die Normen aus. Die an den ausgeschnittenen Herzen gewonnenen Zahlen sind im Gegensatz zu den vorigen relative, d. h. Konzentrationen. Sie sind im allgemeinen unschärfer als diese, und um so unschärfer, je geringer die verglichenen Wirkungsintensitäten. Deshalb wurde das ausgeschnittene Herz nur gewählt, wenn die Messung am ganzen Tier aus besonderen Gründen unmöglich war. Diese Messungen haben denn auch mehr prinzipielle wie ziffernmäßige Bedeutung.

Die äußere Schwierigkeit der Untersuchung liegt in der geringen Wasserlöslichkeit der meisten der untersuchten Substanzen. Diese sind alle gut in Alkohol und mehr oder weniger schlecht in Wasser löslich. In den meisten Fällen sind die gesättigten rein-wäßrigen Lösungen noch viel zu verdünnt, um in der maximalen Flüssigkeitsmenge von 0,5 ccm, die man dem Tier injizieren kann, eine wirksame Dosis unterzubringen. Dann mußten verdünnt-alkoholische Lösungen verwendet werden. Da mit zunehmendem Wasserzusatz die gelösten Substanzen zum Teil ausfallen, bis bei sehr hohen und deshalb praktisch unbrauchbaren Verdünnungsgraden die reine Wasserlöslichkeit eintritt, mußten die jeweils stabilen Lösungen erst ausprobiert werden. Ich werde auf diese Einzelheiten nicht weiter eingehen, die verwandten verdünnt-alkoholischen Lösungen waren stabil. Der so mitinjizierte Alkohol macht natürlich seine eigenen Wirkungen, man kann sie aber scharf von der Digitaliswirkung trennen, da die Alkoholwirkung flüchtig (reversibel), die maximale Digitaliswirkung aber irreversibel ist. Übrigens ließ sich fast in allen Fällen mit einer schwachen Alkoholwirkung auskommen. Die Lösungen wurden so hergestellt, daß eine rein alkoholische Lösung der Substanz mit Wasser auf den eben stabilen Verdünnungsgrad gebracht wurde.

[1]) Proc. Americ. Pharmaceut. Assoc. 1901.

Glykosid und Genin.

Die Lösungen der von mir verwandten Substanzen wurden stets vor dem Versuch frisch hergestellt und nicht erwärmt, eine übrigens entbehrliche Sorgfalt.

1. Digitoxin und Digitoxigenin. Das Digitoxin besteht nach Kiliani aus dem Digitoxigenin und zwei Molekülen des Zuckers Digitoxose ($C_{22}H_{32}O_4 + 2\,C_6H_{12}O_4$). Verwendet wurde das Digitoxin Merck und das krystallisierte Digitoxigenin von Kiliani.

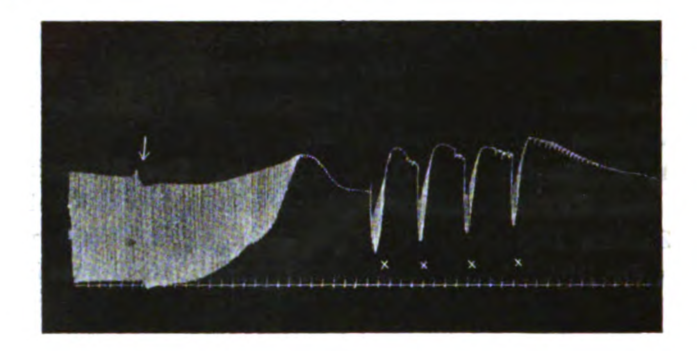
Die tödliche Minimaldosis für Digitoxin wurde in den Jahren 1914 bis 1916 in den Wintermonaten an männlichen Temporarien scharf zu 0,0000036 g pro Gramm Frosch bestimmt.

Die Wirkung des Genins ist kompliziert. 0,000004 g pro Gramm Frosch bewirken eine unter Schreikrämpfen eintretende Lähmung, die nach mehreren Stunden wieder zum Normalzustand führt. Hier besteht also sicher nicht die tödliche Digitalisherzwirkung. Von 0,000005 g aufwärts sterben die Tiere im Lähmungszustand; hier kann eine gleichzeitig bestehende Herzwirkung durch die Lähmungserscheinungen überdeckt sein. Öffnet man ein mit 0,00001 getötetes Tier, so findet man das Herz stillstehend, den Ventrikel meist in starker Annäherung an den tonischen Stillstand wie bei reiner Digitaliswirkung. Unter 0,00001 g ist der Stillstand rein diastolisch im Momente der Öffnung des Thorax; durch mechanische Berührung — aber auch ohne diese, dann aber in längerer Zeit — schrumpft er unter Tonusentwicklung, und ohne zu schlagen, zum maximalen tonischen Stillstand zusammen. Schneidet man so ein Herz aus und bringt es an eine Straubsche Kanüle mit 1,0 ccm Ringer-Lösung, so ist es nicht mehr zum Schlagen zu bringen, es ist also nicht erstickt (Narkose), sondern befindet sich in einem Zustande echter Digitalisvergiftung von tödlicher Intensität. Durch mehrmaliges Waschen ist dieser Zustand bei 0,00001 g Digitoxigenin nicht mehr zu beheben, bei Vergiftung mit 0,000005 g kann aber noch ein Rhythmus erreicht werden, wenn auch gegen den Normalrhythmus verlangsamt. Als sicher herztödliche Dosis Digitoxigenin kann

0,000006 g pro Gramm Temporaria

gelten; da die Wirksamkeit des ganzen Glykosids Digitoxin

0,0000036 g pro Gramm Frosch ist,



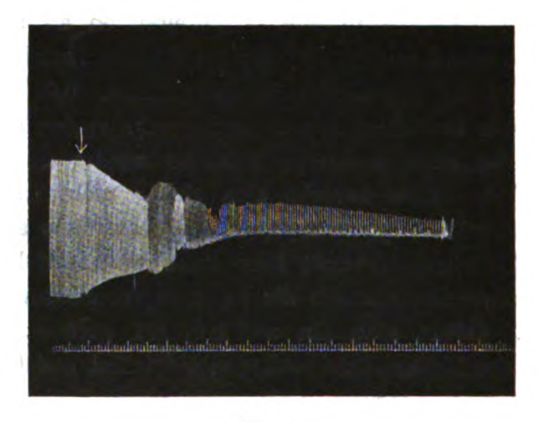


Fig. 1.

Oben. Digitoxin $^1/_{200\,000}$. X Waschversuche ohne Erfolg.
Unten. Digitoxigenin $^1/_{20\,000}$ mit 1 % Alkohol.

hat das Genin rund die halbe Wirksamkeit des ganzen Glykosids.

Die prinzipielle Frage: „Wirkt das Digitoxigenin am Herzen rein digitalisartig?" ist einfach am ausgeschnittenen Organ[1]) zu beantworten. Fig. 1 ist die Wirkung von 1 ccm Digitoxigeninlösung $^1/_{20\,000}$, sie zeigt typische Tonuswirkung und Halbrhythmus (keine Spontanerholung). Die gleiche Konzentration Digitoxin wirkt übermaximal, die Maximumgrenze wird etwa von der Konzentration $^1/_{200\,000}$ erreicht. Digitoxigenin $^1/_{100\,000}$ hat ohne Aufhebung des Rhythmus eine noch merk-

[1]) Die Versuche am ausgeschnittenen Herzen wurden aus äußeren Gründen an Esculentenherzen angestellt, die an sich weniger digitalisempfindlich sind wie die der Temporaria. Die Werte am isolierten Herzen und am ganzen Tier sind also hier nicht vergleichbar.

liche Tonuswirkung; von gleicher Wirksamkeit ist das Digitoxin noch in der Konzentration $^1/_{500000}$.

Das Digitoxigenin hat am ganzen Tier eine doppelte Wirkung, die typische beständige Herzwirkung und die flüchtige Nervenwirkung (Reizung des Mittelhirns mit folgender Lähmung des ganzen Zentralnervensystems). Es wäre eine ansprechende Hypothese, anzunehmen, daß die geringere Toxizität der Substanz für das Herz von der Verteilung an zwei Abnehmer, Herz und Zentralnervensystem, bedingt ist. Die Versuche am ausgeschnittenen Herzen, die ebenfalls eine geringere Wirksamkeit des Genins ergaben, sprechen aber nicht für diese einfachste Erklärung.

Hinsichtlich der Beziehung zwischen Wirkung und Bau ergibt sich, daß die prinzipielle Herzwirksamkeit des ganzen Moleküls im Genin liegt, daß aber die Herzspezifität erst durch den Eintritt des Zuckermoleküls entsteht.

Anm.: Das Digitoxigenin ist schon früher von Boehm[1]) geprüft worden, der die Krampfwirkung der Substanz besonders hervorhebt. Schmiedeberg[2]) will aus Digitoxin eine nicht definierte harzige Substanz „Toxiresin" von pikrotoxinartiger Wirkung[3]) erhalten haben; es ist klar, daß der wirksame Anteil dieses Harzes das Digitoxigenin war.

2. Digitalinum verum und Digitaligenin. Das krystallisierte Digitaligenin Kiliani ist so schlecht in Wasser löslich, daß der Titer der Substanz am ganzen Tier nicht zu stellen ist. Immerhin läßt sich aber zeigen, daß ein mit Digitaligenin behandeltes Tier an einer Dosis Digitoxin oder Strophanthin zugrunde geht, die merklich kleiner ist, als dem Titer der Supplementglykoside entspricht. Da (nach noch nicht veröffentlichten Untersuchungen) die Teildosen verschiedener Glykoside sich rein additiv verhalten, also 0,5 Dos. let. min. Digitoxin + 0,5 Dos. let. + Strophanthin die Vollwirkung haben, läßt sich nachweisen, daß vom Digitaligenin wirksame Mengen resorbiert worden sind, dieses also prinzipiell wirksam ist (Supplementmethode).

Auch am ausgeschnittenen Herzen lassen sich vergleichbare Zahlen für die Substanz nicht gewinnen. Die Lösung $^1/_{100000}$ ist in 1 % Alkohol stabil, sie hat eine sichere Tonus-

[1]) Kurz mitgeteilt bei Kiliani, Arch. d. Pharmaz. **251**, 587, 1913.

[2]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **3**, 37, 1875.

[3]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **4**, 191, 1875.

wirkung, wenn es auch nicht zum tonischen Stillstand kommt, die Alkoholkonzentration ist an sich noch unwirksam. Stärkere Geninkonzentrationen lassen sich bei 1 % Alkohol nicht herstellen, und eine Vermehrung des Alkohols ist unzulässig wegen seiner eigenen Wirksamkeit. Immerhin ist aber sicher, daß das Digitaligenin typisch wirksam ist. Die Digitalinum verum-Wirkung am ausgeschnittenen Herzen ist viel stärker, $^{1}/_{100000}$ hat hier eine sehr deutliche Tonuswirkung, so daß das Genin als jedenfalls wesentlich weniger wirksam gelten muß als das Glykosid, abgesehen von der formalen Wirkungsbehinderung durch die Wasserunlöslichkeit.

Diesen beiden Glykosiden aus Digitalis purpurea sind anzureihen die Digitaliodsubstanzen Cymarin und Strophanthin.

3. Cymarin und Cymarigenin. Das Cymarin ist nach Windaus und Hermanns der Äther des Cymarigenins $C_{23}H_{30}O_5$ mit der Cymarose $C_7H_{14}O_4$, einem Zucker, der von den Autoren als der Methyläther der Digitoxose angesehen wird.

Der Wirkungswert des Cymarins wurde mehrmals zu 0,0000008 g pro Gramm männliche Temporaria bestimmt.

Das krystallisierte Genin ist in verdünntem Alkohol ausreichend löslich, bei der Konzentration $^{1}/_{10000}$ tritt erst in 1 % Alkohol eine opalescente Trübung auf.

Die Wirksamkeit für männliche Temporarien ist 0,0000025 g pro Gramm Frosch, also zweieinhalbmal geringer als die des ganzen Glykosids. Auch hier herrscht die Besonderheit wie beim Digitoxigenin, daß die Ventrikel bei der tödlichen Grenzdosis nicht maximal tonisch stillstehen; bei der Eröffnung findet man einen halb-diastolischen Zustand, der bei Luftzutritt von selbst in den maximal-tonischen übergeht.

Anm.: Nach Rhode[1]) ist die Entwicklung des tonischen Stillstands ein Vorgang, der mit starkem Sauerstoffverbrauch verläuft (wie die Totenstarre). Da schon vor dem Herztod die Atmung stillsteht, ist die Arterialisierung des Blutes der vergifteten Tiere eine geringe; diese Erstickung scheint offenbar die volle Entwicklung des Tonus zu hemmen. Damit könnten diese „diastolischen" Wirkungen eine Erklärung finden.

An ausgeschnittenen Herzen entwickelt Cymarigenin in der Konzentration $^{1}/_{50000}$ eben noch die volle irreversible Tonus-

---

[1]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **69**, 200, 1912.

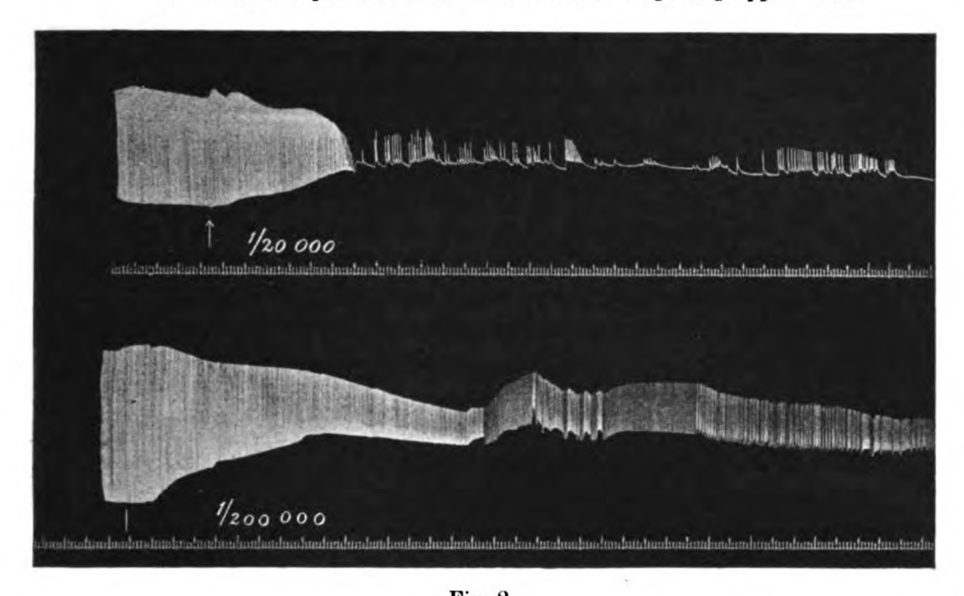


Fig. 2.

Wirkung von Cymarigenin. Oben. $^1/_{20\,000}$ mit 1 % Alkohol.
Unten. $^1/_{200\,000}$ mit 0,1 % Alkohol.

wirkung, die auch bei $^1/_{200\,000}$ noch ausgesprochen ist. Das ganze Glykosidmolekül ist aber viel wirksamer, denn noch $^1/_{1\,000\,000}$ ist maximal tonisch wirksam und noch $^1/_{3\,000\,000}$ von unzweifelhafter Wirksamkeit.

Am ganzen Tier bei Injektion in den Lymphsack sind bei Cymarigenin Nebenwirkungen nach Art der beim Digitoxigenin beobachteten sicher nicht vorhanden.

Es gilt also hier wie beim Digitoxin der Satz, daß die Wirksamkeit des Genins durch die Verätherung mit Zucker zwar aufs Mehrfache gesteigert, aber nicht erst geschaffen wird.

4. Kombé-Strophanthin und sein Genin Strophanthidin. Die Wirksamkeit des k-Strophanthidins ist schon bekannt und neuerdings von Gröber (l. c. Literatur!) eingehend studiert worden. Meine Angaben bringen also in diesem Punkte nichts prinzipiell Neues. Verwendet wurde k-Strophanthidin, das von Prof. Windaus aus dem Strophanthin Böhringer dargestellt worden ist.

Der Wert für k-Strophanthin in den Wintermonaten der letzten Jahre ist wiederholt mit 0,000 000 75 g pro Gramm Tempo-

raria bestimmt worden, der des Strophanthidins unter gleichen Bedingungen zu 0,0000025 g pro Gramm Frosch. Der Wert ist scharf zu erreichen, da das Genin genügend wasserlöslich ist.

Die Werte am ausgeschnittenen Herzen sind gleich den Cymarinwerten.

Nach Windaus und Hermanns sind k-Strophanthidin und Cymarigenin identisch, in den ganzen Glykosiden sind nur die Zuckerpaarlinge verschieden. Da die Titerwerte für die ganzen Glykoside ebenfalls übereinstimmen, scheint die Verschiedenheit der Zucker für die Herzwirkung ohne Bedeutung zu sein, immerhin wäre es aber denkbar, daß sie an den Nebenwirkungen sich bemerkbar macht, die ja nach Behauptungen der Praxis bei Cymarin eigenartig zu sein scheinen.

Die Tabelle stellt die für die vier Glykoside gewonnenen Wirksamkeitswerte bei Subcutaninjektion für Temporarien zusammen.

Tabelle I.

				Wirksamkeits-verhältnis
Digitoxin	0,0000036	Digitoxigenin	0,000006	2 : 1
Digitalin	—	Digitaligenin	—	—
k-Strophanthin	0,00000075	Strophanthidin	0,0000025	3 : 1
Cymarin	0,0000008	Cymarigenin	0,0000025	3 : 1

Es ist bemerkenswert, daß die Wirksamkeitszunahme durch die Zuckeranlagerung für alle untersuchten Glykoside etwa die gleiche ist, obwohl diese unter sich verschiedenwertig sind, wie z. B. das Digitoxin nur ein Sechstel der Wirksamkeit des Strophanthins besitzt.

Konstitution und Wirksamkeit.

Windaus und Hermanns haben bisher folgenden Bau des Cymarins ermittelt

$$(C_{22}H_{29}O_2) \begin{cases} O . C_7H_{13}O_3 \\ -C:O \\ \;\;| \\ O \end{cases} = \text{Cymarin.}$$

Es ist also eine Lactongruppe vorhanden und in einem alkoholischen Hydroxyl (als Seitenkette) dessen H durch den Zucker die Cymarose, eine Methyldigitoxose, vertreten. Durch Salzsäurebehandlung wird der Zucker abgespalten, es bleibt Cymarigenin (= Strophanthidin)

$$(C_{22}H_{29}O_2) \overset{\diagup OH}{\underset{\diagdown \underset{O}{|}}{-C:O}} = \text{Cymarigenin.}$$

Wird hingegen das Cymarin mit Kalilauge behandelt, so bleibt die Cymarose im Molekül, nur die Lactonbindung wird gesprengt, es entsteht das Alkalisalz der glykosidischen Oxysäure (Cymarinsäure)

$$(C_{22}H_{29}O_2) \overset{\diagup O\,.\,C_7H_{13}O_3}{\underset{\diagdown OH \;\diagdown OH}{-C:O}} = \text{Cymarinsäure.}$$

Aus dieser entsteht durch Salzsäurespaltung unter Cymaroseaustritt ein neues Lacton

$$(C_{22}H_{29}O_2) \overset{\diagup \overset{O}{|}}{\underset{\diagdown OH}{-C:O}} = \text{Isocymarigenin (Strophanthidinsäurelacton),}$$

das dem Cymarigenin isomer, aber konstitutionsverschieden ist. Zu dem gleichen Körper gelangt man auch vom Cymarigenin aus.

Das Isocymarigenin ist auch als Strophanthidinsäurelacton vom k-Strophanthin aus zu erhalten.

Diese Substanzen habe ich untersucht. Über Cymarin und Cymarigenin ist im vorigen Abschnitt berichtet.

Cymarinsäure. Die reine Säure ist in Alkohol gut und in Wasser schlecht löslich, die für Wertbestimmung genügend alkoholverdünnten Lösungen enthalten zu wenig Cymarinsäure, so daß aus diesen Versuchen nur auf eine sehr geringe Wirksamkeit geschlossen werden konnte. Hingegen lassen sich durch Auflösen in wenig Sodalösung konzentrierte reinwäßrige Lösungen des Natronsalzes herstellen, an denen die Wirksamkeitsbestimmung gelang.

Es beträgt die Toxicität 0,000 42 g pro Gramm Temporaria. Die Wirkung ist eine reine Digitaliswirkung mit Tonusstillstand, wie besonders am ausgeschnittenen Herzen ermittelt wurde (Fig. 3). Auch hier ist die Wirksamkeit eine recht geringe, denn erst die Konzentration $^1/_{250}$ ist maximal wirksam.

Isocymarigenin, das verwandte Präparat, stammte nicht vom Cymarin, sondern war das dem obigen identische Strophan-

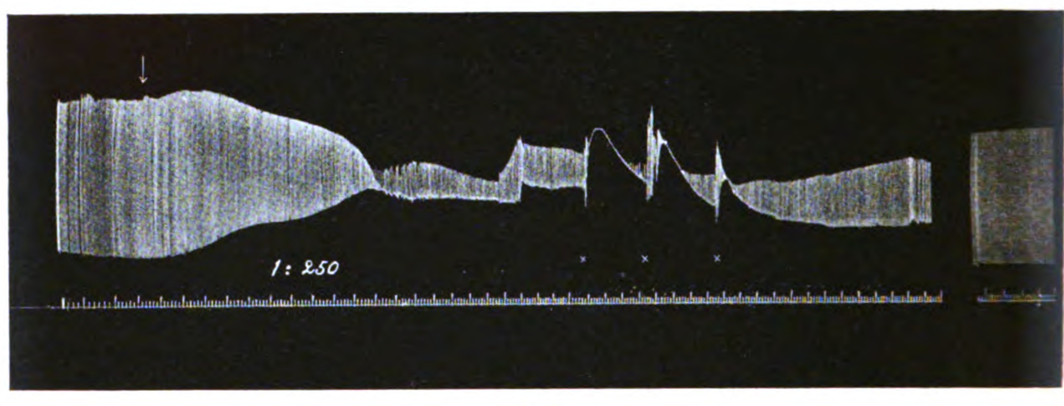


Fig. 3.

Cymarinsaures Natron $^1/_{250}$. Wirkung durch Waschen noch zu beheben.

thidinsäurelacton. Trotzdem sich die Substanz in wäßrigem Alkohol genügend lösen läßt, konnte am ganzen Tier die Toxicität nicht ermittelt werden. Auch am ausgeschnittenen Herzen zeigten Lösungen $^1/_{10\,000}$ nur eine zweifelhafte Andeutung von Tonuswirkung, wie sie von Cymarin etwa in der Verdünnung $^1/_{5\,000\,000}$ erreicht wird. Dieses Isomere des Cymarigenins ist also fast ganz unwirksam.

Demnach ergaben sich für die ganze Reihe folgende Werte:

Cymarin . . .	0,0000008	g	pro	Gramm	Frosch
Cymarigenin . .	0,0000025	„	„	„	„
Cymarinsäure .	0,00042	„	„	„	„
Isocymarigenin .	unmeßbar.				

Es sind also Konstitutionsänderungen an den Seitenketten von äußerst einschneidender Bedeutung für die Wirksamkeit, so daß die noch glykosidische Cymarinsäure 500 mal weniger wirksam ist als ihr Lacton[1]), das Cymarin. Noch einschneidender ist die Verwandlung des Zymarigenins in das Isocymarigenin mit einer fast totalen Wirksamkeitsaufhebung.

Andere Substanzen aus Cymarin.

Anhydrocymarigenin $C_{23}H_{28}O_4$, das nach Windaus (Privatmitteilung) dem Digitoxigenin nahe zu stehen scheint, ist wegen

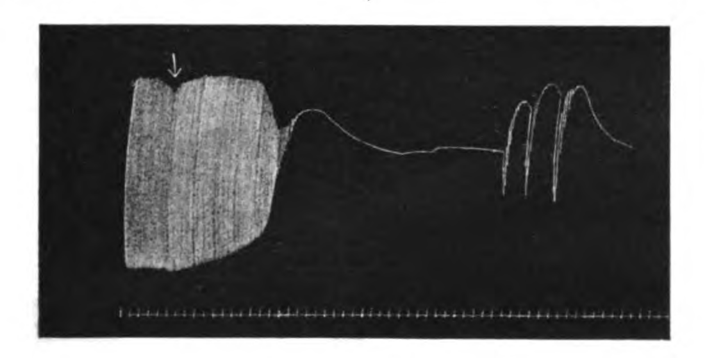
[1]) In diesem Zusammenhange sei an die Beobachtung von Windaus (Dissert. Freiburg 1899) erinnert, daß das wahrscheinliche Lacton Digitalein beim Übergang in die Säure unwirksam wird.

zu geringer Wasserlöslichkeit am ganzen Tier nicht zu messen. Am ausgeschnittenen Herzen hat die Lösung $^1/_{25000}$ eine deutliche Wirkung, wenn auch schwächer wie Digitoxigenin gleicher Konzentration.

Besonderes Interesse verdienen die Benzoate des Cymarigenins bzw. Strophanthidins. Diese Substanzen sind Aufbauprodukte des Cymarigenins und enthalten an Stelle des Zuckers einen Benzoesäurerest, sie sind also im Gegensatz zu den Stammglykosiden (Zuckeräthern) Genin-Ester.

Dieser Benzoesäure-Ester ist weniger leicht in verdünntem Alkohol löslich wie das Genin, die verlangten Lösungen ließen sich aber noch herstellen. Seine Wirksamkeit am ganzen Tier ist:

	0,000025	g	pro	Gramm	Temporaria,	
gegen	0,0000025	„	„	„	„	bei Cymarigenin
und	0,0000008	„	„	„	„	„ Cymarin.



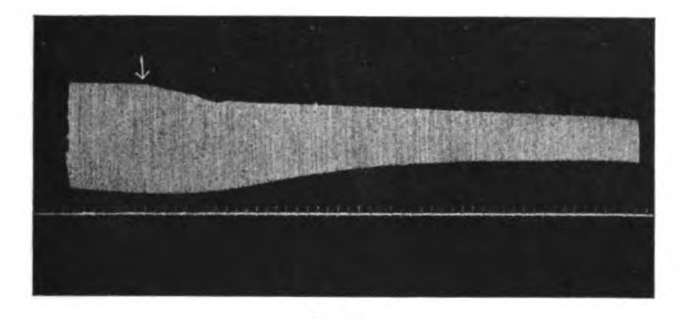


Fig. 4.

Wirkung des Benzoesäureesters des Cymarigenin. Waschversuche vergeblich. Oben. $^1/_{50000}$.
Unten. $^1/_{500000}$.

Am ausgeschnittenen Herzen liegt die Grenze der maximalen Wirksamkeit bei der Konzentration $^1/_{50000}$, aber auch $^1/_{500000}$ hat noch deutliche Tonuswirkung (Fig. 4).

Die Veresterung mit Benzoesäure hat also doch ein ganz anders zu bewertendes Molekül geschaffen, das dem zugehörigen glykosidischen Äther 30 fach nachsteht, dem Genin dreifach. Da der Ester weniger wirksam ist wie das Genin, fällt auch die Annahme weg, daß er im ganzen Tier nach Maßgabe seiner Verseifung wirke.

Im ganzen kann man nach den gemachten Messungen sagen, daß die Lactongruppe von wesentlicher Bedeutung ist für die Wirksamkeit des Cymarins, obwohl keins der anderen Produkte ganz unwirksam ist. Bei der Substitution am H-Atom des Hydroxyls kommt es wesentlich auf die Natur der Substituenten an, das Optimum liegt bisher bei den von der Pflanze gebauten Zuckeräthern. Hier würden weitere Syntheseversuche einsetzen müssen. Ich begnüge mich mit der Feststellung dieser Tatsachen. Spekulationen über unmittelbare Beziehungen zwischen Konstitution und Wirkung und Natur der Verbindung von Gift und lebendem Organ sind wie immer müßig.

Studien zur Chemie und Physiologie der Blutgerinnung.

II.

Weitere Untersuchungen an Fibrinogenlösungen. Das Thrombin und seine Bestandteile.

Von

E. Herzfeld und R. Klinger.

(Aus dem chemischen Laboratorium der medizinischen Universitätsklinik und aus dem Hygiene-Institut der Universität Zürich.)

(Eingegangen am 27. März 1916.)

In unserer vorhergehenden Mitteilung wurde gezeigt, daß für die Fällung von Fibrinogenlösungen die Wegnahme resp. Umwandlung von gewissen, die kolloidale Lösung des Fibrins vermittelnden Abbauprodukten entscheidend ist. Im folgenden sollen weitere Tatsachen, die für die Richtigkeit dieser Behauptung sprechen, erbracht und die der Fällung (mit und ohne Thrombin) zugrunde liegenden Vorgänge eingehender analysiert werden.

Wir wollen uns zunächst die Frage vorlegen: In welcher Form die Abbauprodukte bei der Lösung resp. Fällung des Fibrins in Aktion treten. Es ist eine bekannte Tatsache, daß zur Auflösung von Eiweiß ein gewisser Salzgehalt des Lösungsmittels erforderlich ist; dies legt die Vermutung nahe, daß die Abbauprodukte nicht in Form von freien Polypeptiden, Aminosäuren usw., sondern als Verbindungen derselben mit Salzen, wahrscheinlich als Neutralsalzverbindungen nach Pfeiffer[1]) für die Löslichkeit in Betracht kommen. Es ist auffallend, daß NaCl in den meisten Fällen als Eiweißlösungsmittel funktioniert und nur gesättigte Kochsalzlösung (u. z. auch nicht

[1]) Pfeiffer u. v. Modelski: H. 81, S. 331, 1912; H. 85, S. 1, 1913. — Pfeiffer u. Wittka: Ber. Jg. 48, H. 12, S. 1289, 1915.

immer) durch Wasserentziehung fällend wirkt. Aus den bisherigen diese Frage betreffenden Untersuchungen scheint hervorzugehen, daß durch Anlagerung des NaCl an die NH_2-Gruppe der Aminosäuren eine leichtere Löslichkeit der betreffenden Verbindung bedingt wird.

So kann man z. B. 0,1 g Tyrosin in 50 ccm kochendem destillierten Wasser auflösen, aus welcher Lösung es sich nach dem Erkalten in Form von seidenglänzenden Nadeln abscheidet. Löst man dagegen die gleiche Menge Tyrosin in 50 ccm physiologischer Kochsalzlösung auf, so erfolgt eine raschere Auflösung, ohne daß sich bei Erkalten auf Zimmertemperatur etwas abscheiden würde. Es ist anzunehmen, daß sich hierbei eine NaCl-Salzverbindung bildet, die größere Wasserlöslichkeit aufweist. Ähnliche Neutralsalzbildungen dürften auch bei den übrigen Eiweißabbauprodukten vorkommen.

Nach dem soeben Ausgeführten können wir uns die bei der Darstellung von Fibrinogenlösungen ablaufenden Vorgänge wie folgt vorstellen: Durch partielles Aussalzen (Wasserentziehung) erhält man eine schleimige Masse von Fibrinogen, die nur noch einen Teil der im Serum vorhandenen Abbauprodukte adsorbiert enthält (der größte Teil derselben ist bei der Salzfällung in der Lösung zurückgeblieben). Dieser Fibrinogenniederschlag löst sich in reinem Wasser nur ganz wenig auf (entsprechend dem noch anhaftenden NaCl des Fällungsmittels), dagegen gut in einer 0,5- bis $2^0/_0$igen NaCl-Lösung. Die Notwendigkeit des NaCl weist unserer Ansicht nach darauf hin, daß die noch vorhandenen Abbauprodukte erst dann die kolloidale Verteilung der Eiweißmasse bewirken können, wenn sie in die Form von NaCl-Salzverbindungen übergeführt und so vom Eiweiß adsorbiert sind. Sobald der Salzzusatz diese Umwandlung ermöglicht, hellen sich die Ränder der Fibrinogenklumpen immer mehr auf, das Eiweiß löst sich unter Schlierenbildung ab und zerteilt sich in nicht mehr sichtbare Teilchen. Die erhaltene Fibrinogenlösung besteht somit aus kolloidalem Fibrinogen nebst NaCl-Salzverbindungen seiner Abbauprodukte; die letzteren finden sich in einer Menge, die zur Lösung genügt. Wird die Salzkonzentration durch Zusatz von Wasser stärker herabgesetzt, so kommt es zuerst zu einer opalescenten Trübung der Lösung, die dann nach kürzerer oder längerer Zeit zu einer flockigen Ausscheidung von Fibrinogen führt, das sich am Boden des Röhrchens absetzt

Vermutlich sind die NaCl-Salzverbindungen in zu stark verdünnter Lösung nicht mehr haltbar, sondern zerfallen in ihre beiden Bestandteile, wodurch die kolloidale Verteilung des Fibrinogens nicht mehr möglich ist (hinzu kommt noch der Umstand, daß die Abbauprodukte auf diese Weise vom kolloidalen Fibrin gewissermaßen ausgelaugt werden). Ähnlich sind die Vorgänge bei der Dialyse einer Fibrinogenlösung gegen Wasser. Die fällende Wirkung einer Herabsetzung der Salzkonzentration ist auch bei manchen anderen Eiweißlösungen (Globuline anderer Art) erkennbar; so wird bekanntlich Serum durch stärkere Verdünnung mit Wasser meist deutlich opalescent.

Für die uns beschäftigenden Vorgänge ist es nun nicht gleichgültig, welche Art von Salzen bei der Lösung von Fibrinogen zugegen ist. Es ist z. B. bekannt, daß man bei der Herstellung von Eiweißlösungen kalkfreies NaCl benutzen muß, da sonst unvollständige Lösung oder eine allmähliche Trübung der Lösung eintritt. Wegen der bedeutsamen Rolle der Calciumsalze bei der Gerinnung war es für uns von Interesse, das Verhalten derjenigen Eiweißkörper, welche die Eigenschaft der Gerinnbarkeit aufweisen, gegenüber Kalksalzen näher zu untersuchen. Hierher gehören neben Fibrinogen noch Casein und Myosin, die unter geeigneten Bedingungen gerinnen, d. h. mit Einschluß des Wassers erstarren. Es ergab sich, daß alle diese Eiweißkörper aus Lösungen durch $CaCl_2$ ausgefällt werden können.

Als Beispiele seien folgende Versuche erwähnt:

a) 5 g gut gereinigtes Casein + 0,5 g Natriumbicarbonat werden in 100 g Wasser gebracht, worin sich das Casein nach 15 bis 30 Min. langem Stehen im Brutschrank glatt auflöst. Setzt man zu 5 ccm dieser Lösung 1 ccm einer 5%igen $CaCl_2$-Lösung hinzu, so gerinnt sofort das ganze Casein als eine dick-klebrige Masse. Wir möchten ganz besonders hervorheben, daß diese Gerinnung bei Bicarbonat-Alkalescenz vor sich geht und daß diese alkalische Reaktion auch nach der Koagulation noch nachweisbar ist. Wir haben somit das Beispiel eines Eiweißkörpers, der (ähnlich wie die Fibringerinnung im Blute) bei schwach alkalischer Reaktion auszufallen vermag.

b) Fibrinogenlösungen (in Kochsalz) werden durch Kalksalze je nach ihrer Beschaffenheit (s. unten) bald schneller (2 bis 4 Std.) und unter typischer Gerinnung, bald nur sehr langsam und dann meist flockig ausgefällt.

c) Myosin, das auf Zusatz von verdünnter Säure oder anderen Eiweißfällungsmitteln sofort typisch gerinnt, gibt mit $CaCl_2$ nach einiger Zeit nur eine flockige Fällung.

Wir sehen somit, daß wir bei diesen drei zur Gruppe der Globuline gehörenden Eiweißkörpern durch bloßen $CaCl_2$-Zusatz wenn auch nicht immer Gerinnungen, so doch stets Fällungen erzeugen können. Nach dem oben für die Lösung der Eiweißkörper Gesagten ist anzunehmen, daß nach Zugabe von $CaCl_2$ eine Salzverbindung mit den Abbauprodukten entsteht, die an das Eiweißkolloid adsorbiert wird, und dasselbe zur Ausfällung bringt.

Wir werden auf die Bedeutung dieser $CaCl_2$-Verbindungen für die Fibringerinnung im folgenden noch zurückkommen, wenn wir das Verhalten verschieden hergestellter Fibrinogenlösungen gegenüber Kalk näher untersucht haben werden.

Bei unseren Versuchen fiel uns nämlich auf (und ähnliches haben auch alle Forscher, die sich mit der Herstellung von Fibrinogenlösungen beschäftigt haben, beobachtet), daß die wesentlichen Eigenschaften desselben, wie ihr Verhalten gegenüber Verdünnung, Kalk- oder Thrombinzusatz, sowie bei Dialyse, je nach der Darstellungsweise etwas verschieden sind (ein gleichartiges Ausgangsmaterial vorausgesetzt). So konnte z. B. eine verschiedene Beschaffenheit der Fibrinogenlösung je nach der Menge des zur Fällung benutzten Ammonsulfats nachgewiesen werden.

Wie wir schon angegeben haben, wird Rinderplasma durch reine gesättigte NaCl-Lösung āā allein nicht ausgefällt, während schon ein geringer Zusatz von $(NH_4)_2SO_4$ zu dem mit gesättigter NaCl-Lösung versetzten Plasma die Fällung auslöst. Als günstigste Mengenverhältnisse haben wir hierbei die Zugabe von āā gesättigter NaCl-Lösung $+ {}^1/_4$ Volumen (auf das ursprüngliche Plasma bezogen) gesättigter Ammonsulfatlösung befunden. Diese Angaben beziehen sich auf Rinderoxalatplasma (durch scharfes Zentrifugieren zellfrei gemacht), mit dem wir am häufigsten gearbeitet haben. Beim Pferdeoxalatplasma kann man schon durch Zufügen des gleichen Volumens gesättigter NaCl-Lösung das gesamte Fibrinogen zur Ausfällung bringen. Wird die Fällung durch Zusatz von mehr Ammonsulfat vollzogen, so resultiert ein Fibrinogenniederschlag, der eine stabilere, gegen Thrombin weniger empfindliche Fibrinogenlösung liefert; es hängt dieses Verhalten wohl mit einer teilweisen Mitfällung von anderen Stoffen (vermutlich Plasma-Globulinen) zusammen.

Protokoll 1. Je 100 ccm Oxalatplasma wurden (nach Zentrifugieren) mit 100 ccm gesättigter NaCl-Lösung und a) 25 ccm, b) 40 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt. Der durch Zentrifugieren isolierte Niederschlag in 100 ccm 2%iger NaCl-Lösung gelöst. Von der Lösung wurden je 10,0 ccm mit 20 ccm Wasser verdünnt und davon je 1,0 ccm in 2 Reihen mit fallenden Thrombinmengen geprüft (0,5, 0,2, 0,05, auf 1,0 mit phys. NaCl ergänzt). Es gerinnt

	Thrombin			$CaCl_2$ allein
	0,5	0,2	0,05	0,3
Lösung a	2′	4′	7′	140′
„ b	$6^1/_2$′	13′	30′	210′

Auch gegenüber bloßem Kalkzusatz ist Lösung a empfindlicher als Lösung b. Verfährt man in der oben angegebenen Weise, so gelangt man zu einer ersten Fibrinfraktion (I). Diese enthält aber noch Eiweißabbauprodukte, die für die Gerinnbarkeit derselben nicht indifferent sind (s. unten). Dieselben können durch nochmalige Fällung āā mit gesättigter Na-Cl-Lösung (ohne Ammonsulfat) und Wiederauflösen zum größten Teil entfernt werden: Fraktion II. Eine nochmalige Wiederholung dieses Verfahrens liefert Fraktion III.

Wir möchten zuerst einige Eigenschaften erwähnen, die diese 3 Fraktionen schon äußerlich unterscheiden: 1. Aussehen des Niederschlages: I halb durchsichtige, schleimige Masse, II weniger durchscheinend, opaker, III weißlicher, fast ganz opaker Niederschlag. Bei größeren Mengen von Ammonsulfat wird auch I weißer. 2. Löslichkeit: I ist sehr leicht in 0,5- bis 2%iger NaCl-Lösung löslich, II schon etwas schwerer, so daß einzelne Klumpen oder Flocken am Wattefilter zurückbleiben, während III in der Regel nur sehr langsam und unvollständig in Lösung gebracht werden kann. Untersucht man die absolute Menge der Eiweißabbauprodukte, so findet man dieselbe am größten in I, am kleinsten in III, parallel gehend der durch die einzelne Fällung bedingten Verdünnung und ebenso parallel der Löslichkeit des jeweiligen Fibrinogenniederschlages. Es ergibt sich somit, daß für die Löslichkeit des Fibrinogens die Menge der anwesenden Abbauprodukte entscheidend ist. Je größer dieselbe ist, desto leichter gelingt es, den Fibrinogenniederschlag wieder in den kolloidalen Zustand überzuführen. Daher kann Fraktion III, die durch wiederholte Fällung und Lösung weitgehend von Abbauprodukten befreit ist, selbst in

2 % NaCl nicht mehr vollständig aufgelöst werden. Gibt man eine der hierbei suspendiert bleibenden Fibrinflocken in eine klare Lösung der Fraktion I, so löst sich dieselbe darin relativ schnell auf, obwohl der Salzgehalt derselbe und der Gehalt an Fibrinogen sogar größer ist als in III; der hier vorhandene Überschuß an Abbauprodukten vermag eben noch weiteres Fibrin in Lösung zu bringen.

Wir sehen in diesen Tatsachen einen neuen Beweis für die von dem einen von uns aufgestellte Theorie, daß die kolloidale Verteilung von Eiweißkörpern durch die denselben beigemischten Abbauprodukte vermittelt wird und daher nur in dem Maße möglich ist, als solche Körper zugegen sind.

Es sei übrigens erwähnt, daß die Lösung der Fibrinogenniederschläge nicht erst in 2 % NaCl gelingt, sondern in der Regel schon in 0,5 % NaCl erreicht werden kann. Doch sind solche Lösungen (speziell Fraktion II) weniger haltbar, weshalb es sich empfiehlt, zu gerinnungsphysiologischen Untersuchungen in 2 % NaCl zu lösen und vor Gebrauch jeweils 3fach mit Wasser zu verdünnen.

Im folgenden sollen die Eigenschaften der drei auf die angegebene Weise erhaltenen Fraktionen I, II und III näher untersucht werden[1]).

1. Stabilität gegenüber Verdünnung mit Wasser: I ist die stabilste, III die labilste Lösung. So verlangt je 0,5 der in 0,5 % NaCl gelösten Fraktionen für I einen Zusatz von ca. 5,0 ccm, für II etwa 2,5 ccm, für III 2,0 ccm Wasser, um eine zuerst opalescente, später schwach milchige Trübung hervorzurufen, die nach mehreren Stunden zu flockigfetziger Ausscheidung des Fibrins führt. Ähnlich verhalten sich die Lösungen beim Dialysieren gegen NaCl-Lösung. I liefert hierbei, entsprechend seinem größeren Gehalt an Fibrin, ein festeres, zusammen hängendes Koagulum, II und III nur Fibrinbeläge an der Hülsenwand.

Bei Verdünnung mit physiologischer NaCl-Lösung halten sich die 3 Fraktionen in der Regel längere Zeit stabil, später fallen sie (II speziell leicht) mehr oder weniger flockig aus.

2. Verhalten gegenüber Kalkzusatz:

Protokoll 2. Die durch Verdünnung mit 2fachem Volumen Wassers auf 0,7 % NaCl-Gehalt gebrachten Fibrinogenlösungen werden mit steigenden Mengen $CaCl_2$ (auf 1,0 mit phys. NaCl ergänzt) versetzt. In der letzten Reihe wurde neben $CaCl_2$ (0,2) noch Cytozym (Leberlipoidemulsion, 0,2) zugesetzt.

---

[1]) Einige diesbezügliche Angaben haben wir schon in unserer letzten Mitteilung gemacht.

	Menge des $CaCl_2$				Cytozym
	0	0,2	0,5	0,8	0,2
I	M klar	140′	140′	180′	70
II	M flockiger Bodensatz			M netzig	230′ netzig
III	M klar	M Spur feinfetzigen Bodensatzes			M etwas Bodensatz

M = Befund am nächsten Morgen (16h).

Die Fraktion I ergibt mit Kalk versetzt nach 2 bis 3 Stunden eine vollständige Gerinnung, verhält sich also so, wie auf Zusatz von (geringen Mengen von) Thrombin. Durch Cytozym wird diese Gerinnung noch beschleunigt. Es muß daher angenommen werden, daß dieser Fraktion noch Reste von Serozym aus dem Plasma anhaften. Von diesen ist II zum größten Teil, III vollständig befreit (bei III hat Cytozym keine Wirkung mehr, verglichen mit bloßem Kalkzusatz). II und III werden durch Kalkzusatz nur wenig beeinflußt, doch ist auch hier eine größere Labilität bei Gegenwart von $CaCl_2$ ersichtlich.

3. In ihrer Gerinnbarkeit durch Thrombinlösungen unterscheiden sich die 3 Fraktionen nur wenig, I pflegt etwas stabiler als II und III zu sein. III gibt mit kleineren Thrombinmengen oft nur noch unvollständige Gerinnungen, was mit dem geringeren Fibrinogengehalt zusammenhängt.

Protokoll 3. Je 1,0 der Fibrinogenlösung mit fallenden, auf 1,0 ergänzten Thrombinmengen (aus 0,5 Hammelserum, 5,0 NaCl, 0,5 $CaCl_2$ und 0,3 Cytozym, 15′ gestanden). Serie 2 wird vor dem Thrombinzusatz mit 0,2 Na-Oxalat versetzt.

	Thrombin ohne Oxalat			mit Oxalat		
	0,5	0,2	0,05	0,5	0,2	0,05
I	3′	4½′	9′	5′	7′	20′
II	2′	2½′	9′	2′	2½′	9′
III	2½′	8′±	15′±	2½′	4½′	10′

III ergibt somit bei größerem Thrombinzusatz (0,5) sowie mit Ca-Oxalat-Niederschlag vollständige Gerinnungen; mit kleinen Thrombinmengen dagegen (ohne Oxalat) nur eben sichtbare, unvollständige Koagula. I gerinnt etwas später als II, was namentlich im Oxalatmedium hervortritt (wo die fördernde Wirkung des eigenen Serozymgehaltes sich nicht geltend machen kann).

Man sieht also, daß zwar alle 3 Fraktionen (trotz der deutlichen Verminderung des Fibrinogengehaltes in III) noch ge-

nügend Fibrinogen enthalten, um durch entsprechende Thrombinmengen vollständig zu gerinnen, daß aber durch bloßen Kalkzusatz nur I eine eigentliche Gerinnung erfährt, während II und III nur mehr oder weniger flockig ausgefällt werden. Setzt man zu solchen Proben nachträglich noch Thrombin zu, so gerinnen sie meist in toto. Da wir diese Gerinnungen resp. Fällungen auf eine Umwandlung der NaCl- in $CaCl_2$-Salzverbindungen der lösenden Abbauprodukte zurückgeführt haben, so lassen sich diese Ergebnisse so ausdrücken, daß Fraktion I eine größere Menge von **solchen** Abbauprodukten enthält, die sich leicht in $CaCl_2$-Salzverbindungen umwandeln lassen und dadurch zur Gerinnung des Fibrinogens führen, während die Abbauprodukte von II und III in NaCl-Lösungen nur geringe Neigung haben, eine derartige Umwandlung durchzumachen. Hierbei wirkt der Umstand, daß sie zunächst (bei der Auflösung des Fibrinogenniederschlages) in die Form von NaCl-Salzverbindung gebracht wurden, hemmend und täuscht eine gewisse Unempfindlichkeit dieser Fibrinogenlösungen gegenüber $CaCl_2$ vor. Es läßt sich aber leicht nachweisen, daß auch diese Abbauprodukte, als $CaCl_2$-Salzverbindungen an das kolloidale Fibrin adsorbiert, nicht fähig sind, dasselbe in Lösung (Suspension) zu erhalten, sondern dessen Ausfällung bewirken; die Verdrängung des NaCl durch $CaCl_2$ läuft bei ihnen nur langsamer und unvollständiger ab. Wird nämlich z. B. eine Fraktion II anstatt mit NaCl mit gesättigter $CaCl_2$-Lösung (2faches Volumen) ausgefällt, so erhält man einen Niederschlag von Fibrin, der sich in 0,5 % $CaCl_2$-Lösung, ja selbst in NaCl-Lösung (1 bis 2 %) überhaupt nicht löst, sondern ziemlich harte, elastische Fibrinfetzen liefert, ganz ähnlich dem Fibrin, das nach einer durch Thrombin bewirkten Gerinnung auftritt. Wir ersehen daraus, daß auch diese Abbauprodukte mit $CaCl_2$ reagieren und Salzverbindungen liefern, die sich gegen NaCl nicht mehr ohne weiteres umsetzen können. Ein Fibrinogen, das derartige $CaCl_2$-Salzverbindungen adsorbiert enthält, wird unlöslich und zeigt die Eigenschaften des durch Thrombin ausgefällten Fibrinogens; es ist nicht nur physikalisch, sondern auch chemisch von Fibrinogen verschieden und wird im Gegensatz zu diesem als Fibrin bezeichnet.

Wir kommen somit zu der Ansicht, daß die Überführung

der in einer Fibrinogenlösung vorhandenen Abbauprodukte in $CaCl_2$-Salzverbindungen und die Adsorption derselben an die kolloidal gelösten Fibrinogenteilchen die Ausfällung des Fibrins verursacht.

Je mehr von solchen Abbauprodukten vorhanden sind, die leicht mit $CaCl_2$ derartige fällende Salzverbindungen eingehen, desto schneller wird eine Fibrinogenlösung schon bei bloßem Kalkzusatz gerinnen. Am günstigsten wirkt natürlich der Zusatz einer entsprechenden (möglichst großen) Menge schon fertiger, derartiger $CaCl_2$-Abbauprodukte, d. h. eine „Thrombinlösung“ (s. unten). Sind andere, die Lösung des Fibrinogens vermittelnde Abbauprodukte zugegen (z. B. NaCl-Salzverbindungen in unseren reinen Fibrinogenlösungen), so wirken diese der Gerinnung entgegen, und es wird das weitere Verhalten der betreffenden Fibrinogenlösung davon abhängen, ob die einen oder die anderen überwiegen. Wird die Menge der $CaCl_2$-Abbauprodukte vermehrt, sei es direkt durch Zusatz von Thrombin oder indem ein Teil der bisher lösenden NaCl-Salzverbindungen in $CaCl_2$-Salzverbindungen übergeführt wird (Fraktion I + $CaCl_2$), so überwiegt das fällende Moment, und die Lösung gerinnt. Geht die Umwandlung in $CaCl_2$-Verbindungen nicht oder nur in sehr untergeordneter Weise vor sich, so wird die Fibrinogenlösung trotz Kalkzusatz stabil bleiben oder (im Vergleich zur Kontrolle ohne Kalk) nur geringfügige Fällungen erfahren.

Die für den Gerinnungsvorgang in Betracht kommenden Abbauprodukte lassen sich somit folgendermaßen qualifizieren: Alle wirken als NaCl-Salzverbindungen lösend, d. h. sie vermitteln die kolloidale Verteilung des Fibrins. Nach ihrem Verhalten gegenüber Kalk müssen jedoch 2 Gruppen unterschieden werden: die einen gehen leicht aus den NaCl- in $CaCl_2$-Salzverbindungen über („serozymartige“ Körper), die anderen dagegen langsam oder nicht. Sind $CaCl_2$-Salzverbindungen in überwiegender Menge vorhanden, so wird dadurch das Fibrinogen, das dieselben adsorbiert, ausgefällt. Für den Eintritt oder das Ausbleiben der Gerinnung ist es daher entscheidend, ob genügend dieser $CaCl_2$-Abbauprodukte (die, wie wir sehen werden, mit dem Thrombin identisch sind) zugegen sind. Die

gerinnungsfördernden Faktoren sind, wie wir zeigeu werden, solche, die die Bildung derartiger $CaCl_2$-Salzverbindungen anregen, die gerinnungshemmenden solche, die dies verhindern (wenn wir von denjenigen Eingriffen absehen, die durch Herabsetzung resp. Vermehrung der antagonistischen, lösenden Momente wirken).

Wir werden im folgenden wiederholt auf die hier entwickelten Grundvorstellungen des Gerinnungsvorganges zurückkommen. Wir möchten hier im Nachtrag zu unserer früheren Mitteilung einen Versuch anführen, der ein weiteres Beispiel für die hemmende Wirkung, die gewisse Abbauprodukte auf die Gerinnung ausüben, erbringt.

Wir haben inzwischen ein Verfahren ausgearbeitet, das gestattet, aus eiweißhaltigen Flüssigkeiten gewisse, tiefere, vielleicht noch polypeptidartige Abbauprodukte zu isolieren. Dasselbe besteht im wesentlichen in Fällung mit ausgiebigen Mengen absoluten Alkohols; die Abbauprodukte gehen in den Alkohol über und können nach Abdampfen desselben in Wasser gelöst werden. Wir werden auf die diesbezügliche Technik weiter unten näher eingehen. Behandelt man nun reine Fibrinogenlösungen auf diese Weise, so erhält man eine Lösung von Abbauprodukten, die, zu gerinnenden Flüssigkeiten zugesetzt, eine deutliche Hemmung ausüben:

Protokoll 4. Alkoholischer Extrakt aus einer Fibrinogenfraktion II in der Menge von 1,0 und 0,3 wird mit 1 Tropfen Serozym und 0,2 Kalk 10 Min. stehen gelassen (Volumen 1,2 ccm) und hierauf je 1,0 Fibrinogen zugesetzt. Es gerinnt: Röhrchen 1 nach 30 Min., Röhrchen 2 nach 14 Min., die Kontrolle (1,0 NaCl) nach 11 Min.

In unserer früheren Mitteilung haben wir darauf hingewiesen, daß Zusatz von Abbauprodukten bald hemmend, bald fördernd auf die Thrombinbildung einwirkt, wir konnten aber damals dieses wechselnde Verhalten nicht näher erklären. Wir haben nun in dem Verhalten gegenüber Kalk eine erste Tatsache gefunden, die für die Lösung dieser Frage von Wert sein dürfte (ohne natürlich die ausschließlich maßgebende zu sein) und möchten annehmen, daß im allgemeinen solche Abbauprodukte, die leicht $CaCl_2$-Salzverbindungen bilden, fördernd, solche, die dies nicht können, hemmend auf die Gerinnung einwirken werden. Für die Richtigkeit dieser Annahme spricht

neben dem oben mitgeteilten Versuch (die Abbauprodukte in Fibrinogen II sind ja relativ schwer in $CaCl_2$-Verbindungen umwandelbar) auch die Tatsache, daß nach unseren bisherigen Beobachtungen kalkarme Peptone, wie z. B. Seidenpepton und namentlich Fibrinpepton, hemmend, dagegen kalkhaltige, wie Witte-Pepton, fördernd wirken.

Für die Praxis gerinnungsphysiologischer Studien ergibt sich aus unseren Beobachtungen die Forderung, die für qualitative Untersuchungen verwendeten Fibrinogenlösungen stets durch Stehenlassen mit Kalk, sowie Kalk und Cytozym auf einen eventuell vorhandenen Gehalt an serozymartigen Abbauprodukten zu prüfen. Treten hierbei deutliche Gerinnungen auf, so empfiehlt es sich, die Lösungen durch nochmalige Fällung zu reinigen; zu oft darf aber diese Prozedur nicht wiederholt werden, da durch Abnahme der Löslichkeit die Fibrinogenkonzentration verringert wird. Pferdeplasma, das von einigen Autoren zur Darstellung von Fibrinogen vorgezogen wird, hat uns ganz ähnliche Lösungen ergeben wie Rinderplasma. Wir haben das letztere daher vorgezogen, weil es aus dem Schlachthaus stets leicht zu beschaffen ist und uns in der Regel ganz brauchbare Fibrinogenlösungen (Fraktion II) geliefert hat.

Untersuchungen über das Thrombin.

Für die Frage nach dem Wesen der Thrombinwirkung war es zunächst von Bedeutung zu wissen, welche quantitativen Beziehungen (ausgedrückt durch Schnelligkeit und Vollständigkeit der Gerinnung) zwischen der an der Reaktion beteiligten Thrombinmenge und der ausgefällten Fibrinogen- (resp. Plasma-) Menge bestehen. Die Versuchsprotokolle zeigen, daß die erzielten Wirkungen der Menge der in Aktion tretenden Stoffe einfach proportional sind.

Protokoll 5. a) Rinderoxalatplasma wird in fallender Menge (0,5 bis 0,05) mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1 ccm ergänzt und mit 0,5, 0,3 und 0,1 ccm einer frisch bereiteten Thrombinlösung (Hammeloxalatserum 1,0, NaCl-Lösung 8,0, Lipoidemulsion 0,5, $CaCl_2$ [1 %] 0,5 ccm; die Mischung wird nach 15 Min. Stehen verwendet) versetzt. Die Tabelle gibt die Zeit bis zum vollständigen Festwerden in Minuten an, bei unvollständigen Gerinnungen ist der Verlauf derselben näher bezeichnet.

Thrombinmengen	Menge des Oxalatplasmas			
	0,5	0,25	0,1	0,05
0,5	30' Gerinnsel 180' nahezu fest	10' Flocken 19' fest	$3^1/_2$'	3'
0,3	nach 20' Gerinnsel und Ringbildung an der Oberfläche		8'	$4^1/_2$'
0,1	nach 15 bis 30' Gerinnsel und ringförmige Fibrinausscheidungen. Keine Gerinnung.			

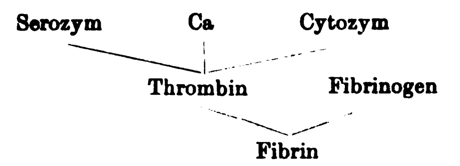
b) Rinderplasma wird mit phys. NaCl-Lösung steigend verdünnt (je 1 ccm) und mit je 0,6 ccm Thrombinlösung versetzt. Es ergibt:

Plasma unverdünnt	10′ Ringbildung	120′ unvollkommen geronnen
āā verdünnt	10′ „	120′ netzig geronnen
1 : 4 „	12′ in toto fest	
1 : 8 „	4′ „ „ „	
1 : 16 „	$3^1/_2$′ „ „ „	
1 : 32 „	$2^1/_2$′ „ „ „	
1 : 64 „	2′ „ „ „	
1 : 120 „	5′ „ „ „	
1 : 250 „	8′ wird nur unvollkommen fest.	

Wir sehen, daß eine gegebene Thrombinmenge nur eine begrenzte Fibrinogenmenge so zur Gerinnung zu bringen vermag, daß die ganze Masse gelatinös erstarrt. Steigt die Menge des Fibrins bei gleichbleibender Thrombinmenge, so wird dadurch zunächst der Ablauf der Gerinnung verzögert; überschreitet sie eine bestimmte Grenze, so kommt es nicht mehr zu vollständiger Koagulation, es fällt nur ein Teil des Fibrins in Form von Flocken oder Fetzen (bei Oxalatplasma häufig ein an der Oberfläche rings am Glas haftender Ring) aus, während die Hauptmasse flüssig bleibt. Wird einem derartigen Röhrchen weiteres Thrombin zugesetzt, so gerinnt es schnell in typischer Weise. Die Gerinnung verläuft somit stets entsprechend den relativen Mengen der an derselben beteiligten Körper, was nach dem im ersten Kapitel Ausgeführten verständlich sein dürfte.

Eine Fermentnatur (katalytische Beschleunigung des Gerinnungsvorganges) kann dem Thrombin nicht zugesprochen werden. Es handelt sich ja darum, daß die $CaCl_2$-Abbauprodukte in einer solchen Menge vorhanden sind, daß sie die lösenden Momente überwiegen. Aus diesem Grunde sind Oxalatplasmen relativ stabiler, d. h. sie brauchen größere Thrombinmengen als reine Fibrinogenlösungen von gleichem Fibrinogengehalt, weil sie reicher an Abbauprodukten sind (siehe diesbezüglich auch Prot. 3, S. 151).

Für die im folgenden durchgeführte Untersuchung der Thrombinkomponenten sollen die bisher üblichen Bezeichnungen und Begriffe, wie wir sie auch in unseren vorhergehenden Arbeiten verwendet haben, beibehalten werden. Nach diesen Vorstellungen läßt sich der Gerinnungsvorgang durch folgendes Schema ausdrücken.



Daraus geht hervor, daß zur Thrombinbildung drei Komponenten erforderlich sind, das Serozym, das Cytozym und Calcium. Wir wollen uns zunächst mit dem einfachsten dieser Körper, dem Calcium, beschäftigen.

A. Die Calciumkomponente.

Das Wesentliche über die Rolle des Calciums wurde bereits im vorhergehenden gesagt. Da das $CaCl_2$ dadurch wirkt, daß es mit den Serozymabbauprodukten Salzverbindungen eingeht, ist es ohne weiteres verständlich, daß es in deutlich meßbaren Mengen an der Reaktion beteiligt ist, nicht etwa schon in kleinsten Mengen als Activator die Bildung beliebiger Thrombinmengen vermittelt, wie auch das folgende Protokoll zeigt:

Protokoll 6. Steigende Mengen einer 1%igen $CaCl_2$-Lösung (0,01 bis 1,0 ccm) werden mit phys. NaCl-Lösung auf 1 ccm ergänzt (3 identische Reihen). Jedes Röhrchen erhält hierauf eine von Reihe zu Reihe wechselnde Serozymmenge (0,02 bis 0,1 ccm Hammelserum) und nach 5 Min. langem Stehen 1,0 ccm einer verdünnten Fibrinogenlösung (Fraktion I) (in 0,5% NaCl, Cytozym wurde in diesem Falle zur Thrombinbildung nicht verwendet).

Serozym	Calciummenge (1% $CaCl_2$)									
	0	0,01	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,5	1,0
0,02	180′ feinnetzig	150′ feinnetzig	60′ feinnetzig 120′ fest	45′ ±	45′ ±	45′ ±	45′ ±	45′ ±	60′ fest	80′ netzig
0,05	180′ ±	130′	13′	11′	10′	11′	12′	12′	16′ ±	35′ netzig 45′ fest
0,1	180′ ±	80′	11′	9′	9′	8′	8′	9′	12′	30′ netzig 45′ fest

± bedeutet Gerinnung mit weichem, nicht ganz festem Koagulum.

Zu geringer Kalkzusatz drückt sich in herabgesetzter Thrombinbildung aus, was in den größeren Gerinnungszeiten und an der verminderten Festigkeit der Koagula erkennbar ist. Ist einmal die erforderliche Kalkmenge zugegen, so fördert weiterer Zusatz die Gerinnung nicht mehr. Das Serozym sättigt sich mit Kalk ab und kann größere Mengen desselben nicht mehr verwerten. Zu hohe Kalkdosen wirken sogar etwas

hemmend, so daß verspätete oder weniger homogene (netzige) Gerinnungen erfolgen.

Auf die Beziehungen des im Thrombin gebundenen Calciums zu Oxalsalzen wird unten eingegangen. Andere Chloride können das Calcium bei der Gerinnung nicht ersetzen. Wir haben in diesbezüglichen Versuchen nur mit Barium- und Manganchlorid zuweilen eine schwache Thrombinbildung gesehen.

Es erhebt sich die Frage, mit welchen der beiden anderen Komponenten des Thrombins das Calcium zunächst reagiert. Der folgende Vorversuch wird uns hierüber orientieren.

Protokoll 7. Möglichst cytozymfrei gewonnenes Hammeloxalatplasma wird durch vorsichtiges Rekalzifieren zur Gerinnung gebracht und daraus durch Auspressen Serum („Serozym") gewonnen. Um den Überschuß von $CaCl_2$ zu entfernen, werden demselben einige Tropfen einer 1 %igen Na-Oxalatlösung zugesetzt. Ferner wird von einem alkoholischen Leberextrakt eine geeignete (40 fache) Verdünnung in NaCl-Lösung hergestellt („Cytozymlösung"). In die Röhrchen wird außer den unten angegebenen Zusätzen je 1,0 NaCl-Lösung abgefüllt, ferner in Röhrchen I—VII nach 15 Min. je 1,0 Fibrinogenlösung zugesetzt.

		Gerinnungszeit
I	0,1 Serozymlösung + 0,2 $CaCl_2$-Lösung (1 %) . . .	10
II	0,1 Cytozymlösung + 0,2 $CaCl_2$-Lösung	flüssig
III	0,1 Serozymlösung + 0,1 Cytozym	fl.
IV	0,1 Serozymlösung + 0,1 Cytozymlösung + 0,2 $CaCl_2$	1'
V	0,1 Serozymlösung	fl.
VI	0,1 Cytozymlösung	fl.
VII	0,2 $CaCl_2$	fl.

Beobachtet 6 Stunden.

Man erkennt, daß die schnellste Gerinnung, d. h. die stärkste Thrombinbildung dort stattgefunden hat, wo alle drei Komponenten vereinigt waren, daß aber Serozym bloß mit $CaCl_2$ ebenfalls eine deutliche Thrombinwirkung ausübt, während die Mischung von Kalk und Cytozym (ebenso wie die einzelnen Komponenten allein) unwirksam geblieben sind.

Es ergibt sich somit, daß das Calcium mit dem Serozym auch in Abwesenheit von Cytozym unter Bildung gerinnungsaktiver Körper zu reagieren vermag, während Cytozym bei Fehlen von Serozym inaktiv bleibt.

Wir werden diesen Befund, der für die theoretische Auffassung des Gerinnungsvorganges von Bedeutung ist, im folgenden Abschnitt noch eingehender untersuchen und einige gegen die gegebene Auffassung mögliche Einwände diskutieren.

B. Die Serozymkomponente.

Über die Natur dieses, mit verschiedenen Namen (Thrombogen, Prothrombin) belegten Stoffes wurde bisher nichts Wesentliches ausgesagt. Pekelharing[1]) hielt es für ein Nucleoproteid; Bordet und Delange[2]) haben die leichte Adsorbierbarkeit desselben an Niederschlägen von Calciumtriphosphat festgestellt und zur Herstellung gereinigter Serozymlösungen benutzt. Hirschfeld und Klinger[3]) haben gezeigt, daß bei Entfernung der Globuline des Serums durch Fällung mit verdünnter Säure die Serozymwirkung an den in Lösung bleibenden Albuminen haftet.

Wir wollen zunächst an Hand einiger Versuchsprotokolle die Bedingungen kennen lernen, die für die Serozymwirkung eines Serums maßgebend sind. Zuerst soll geprüft werden, ob der „Serozymgehalt" eines Serums je nach der Darstellungsweise aus dem Plasma verschieden ist und welcher Art die Gerinnungsaktivität der jeweils erhaltenen Seren ist.

Es erhebt sich hier die Frage, wie wir den Serozymgehalt einer Flüssigkeit feststellen und messen können. Wenn wir von einem in dieser Hinsicht zu prüfenden Serum eine geringe Menge (0,1 ccm) zu einer verdünnten Fibrinogenlösung zusetzen, so beobachtet man in der Regel nach Ablauf von Minuten oder Stunden den Eintritt der Gerinnung; das Serum erwies sich schon ohne weiteren Zusatz als in geringem Grade gerinnungsaktiv. Diese Eigenschaft der meisten Seren wird bekanntlich als deren „Thrombin"-Gehalt bezeichnet. Geben wir nun neben der Fibrinogenlösung noch einige Tropfen einer $CaCl_2$-Lösung zu, so tritt die Gerinnung derselben bei manchen Seren wesentlich schneller ein; noch früher erfolgt sie, wenn wir außer Kalk noch eine kleine Menge eines „Cytozyms" zugesetzt haben. Bei anderen Seren hat dagegen weder der Kalk, noch der Kalk + Cytozymzusatz eine nennenswerte Steigerung der Gerinnungsaktivität zur Folge. Wir bezeichnen die ersteren als serozymhaltig, die letzteren als serozymarm und verstehen somit unter dem „Serozymgehalt" die Fähig-

---

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 89, 22, 1913.

[2]) Bull. Soc. royale Sciences méd. et nat. de Bruxelles Nr. 4, 1914.

[3]) Zeitschr. f. Imm.-Forschg. 20, 51, 1913.

keit eines Serums, Exsudats usw. auf Zusatz von Kalk stärker gerinnungsaktiv zu werden, d. h. Thrombin zu bilden; die durch Kalk erzielbare Steigerung der Thrombinwirkung wird hierbei stets durch „Cytozym" noch weiter erhöht.

Wir haben somit eine Unterscheidung zwischen dem „Thrombin" und dem „Serozymgehalt" einer Flüssigkeit aufgestellt und wollen im folgenden die wechselseitigen Beziehungen dieser beiden Wirkungsmöglichkeiten eines Serums näher untersuchen.

Protokoll 8. Ziegenblut wird im gleichen Volumen 10% NaCl aufgefangen und scharf zentrifugiert. Das klare, farblose Plasma wird abgegossen und in zwei Röhrchen je 1,0 ccm desselben mit 5,0 ccm Wasser verdünnt. Hierdurch wird die normale Salzkonzentration wieder hergestellt und dem Plasma die Möglichkeit zur Gerinnung gegeben. Ein Röhrchen (1) wird der spontanen Gerinnung überlassen, die nach 4 bis 5 Stunden abläuft; das zweite Röhrchen (2) wird mit 0,1 ccm $CaCl_2$-Lösung versetzt und gerinnt bereits nach 10′. Beide Röhrchen bleiben 15 Stunden bei 3° stehen, worauf das Serum mit einer Pinzette von dem Koagulum ausgepreßt wird. Von den so erhaltenen Seren 1 u. 2 wird nach einer Stunde je eine Serie von 3 Röhrchen à 0,5 ccm abgefüllt, 0,8 phys. NaCl, ferner $CaCl_2$ resp. $CaCl_2$ + Cytozym, endlich nach 15 Min. je 1,0 ccm Fibrinogenlösung zugegeben.

Zusatz	Serum 1	Serum 2
0	nach 4 Std. flüssig	13′
1 Tropfen $CaCl_2$	$4^1/_2$′	7′
1 Tropfen $CaCl_2$ + 1 Tropfen Cytozym	1′	$1^1/_4$′

Aus dem Versuch ergibt sich, daß stark mit NaCl-Lösung verdünntes Plasma auffallend langsam, auf Zusatz von $CaCl_2$ dagegen sehr prompt gerinnt; ein Beweis, daß nicht die absolute Menge der Ca-Salze (die im Salzplasma nicht vermindert wurde), sondern das Verhältnis des $CaCl_2$: NaCl für die Gerinnung ausschlaggebend ist. Dieser Befund erklärt sich in dem oben besprochenen Antagonismus der NaCl- und $CaCl_2$-Salzverbindungen in bezug auf die Fibrinfällung. Wir sehen ferner, daß die gerinnungsphysiologischen Eigenschaften eines Serums zum Teil abhängig sind von der Menge der bei der Gerinnung seines Plasmas anwesenden Ca-Salze. Ein mit viel Kalk (und daher unter reichlicher Thrombinbildung) geronnenes Plasma liefert ein „Thrombin"-reiches Serum, d. h. ein solches, das ohne weiteren Zusatz schon deutlich gerinnungsaktiv ist,

während umgekehrt Seren, die mit einem Minimum von Thrombin geronnen sind, sich durch ihren Serozymreichtum auszeichnen, also durch das Vermögen, mit $CaCl_2$ noch weiter Thrombin zu bilden. Noch deutlicher werden diese Verhältnisse, wenn nicht der Kalk, sondern der Cytozymgehalt bei der Gerinnung eines Plasmas variiert wird:

Protokoll 9. Hammelblut wird in $^1/_{10}$ Volumen $1^0/_0$iger Na-Oxalatlösung aufgefangen und scharf zentrifugiert. Von dem so erhaltenen Plasma wird 3,0 ccm einmal ohne weiteren Zusatz (I), in einem anderen Röhrchen unter Zugabe von 0,2 ccm einer gut aktiven Cytozymemulsion (Leberlipoide) rekalzifiert (II); verwendet wurde 0,35 $CaCl_2$-Lösung. I gerinnt nach 20 Min., II nach 2 Min. Aus beiden wird das Serum durch Auspressen gewonnen und über Nacht im Kühlraum aufbewahrt. In Reihe III wird das Serum desselben Tieres geprüft, das aus der spontanen Gerinnung von Gesamtblut (ohne Zusatz, bei der gleichen Venenpunktion aufgefangen) erhalten wurde. Die Prüfung auf Serozym- und Thrombingehalt dieser drei Seren (Technik wie oben) ergibt:

	I	II	III
Menge des Serums[1] . .	0,12	0,13	0,1
Zusatz: 0	fl.	55′	80′
$CaCl_2$	18′	40′	35′
$CaCl_2$ + Cytozym . . .	2′	40′	20′

Der Versuch zeigt, daß eine deutliche Serozymwirkung nur dem ohne Cytozym (resp. cytozymarm) geronnenen Serum eigen ist (I). Sobald das Plasma bei Anwesenheit von reichlichem Cytozym gerinnt, sei es, daß dieses künstlich zugesetzt wird (II), oder aus den Blutzellen bei der Gerinnung frei wird (III), ist es arm an Serozym, enthält aber relativ größere Mengen von „Thrombin“. Seren, die aus der Gerinnung des nicht zentrifugierten Blutes hervorgehen, haben deshalb stets einen geringeren Serozymgehalt als das aus zellfreien Plasmen gewonnene Serum; bei manchen Tieren (z. B. Ratte) oder bei nicht sorgfältiger Entnahme des Blutes kann im gewöhnlichen Serum überhaupt keine Serozymwirkung nachgewiesen werden. (Diese Frage wird noch im Cytozymkapitel [S. 28] beleuchtet werden.)

Im folgenden möchten wir eine Reihe von weiteren Einwirkungen untersuchen, die den Serozymgehalt und damit die Thrombinwirkung eines Serums zu beeinflussen vermögen.

[1]) Mit Rücksicht auf die erfolgten Zusätze gewählte, sich entsprechende Dosen.

Schon die bloße Verdünnung eines geeigneten, d. h. zu Serozymbildung befähigten Serums regt die Entstehung von Serozym an.

Protokoll 10. Eine Reihe von Röhrchen erhält je 1 Tropfen Hammelserum + 1 Tropfen $CaCl_2$ sowie

	Serum I a	Serum I b (Cytozym)	Serum II
Röhrchen 1: kein weiterer Zusatz . .	22′	15′	10′
„ 2: Zusatz 0,2 phys. NaCl .	7′	2′	$8^1/_2$′
„ 3: „ 0,2 H_2O	$7^1/_2$′	$2^1/_2$′	7′
„ 4: „ 0,45 „	$3^1/_2$′	$1^1/_2$′	—

Nach 15 Min. langem Stehen wird je 1,0 ccm Fibrinogen-Lösung zugesetzt. Reihe b von Serum I gibt die Werte bei Zusatz von Cytozymlösung (1 Tropfen). Bei Serum II ist die Versuchsanordnung eine ähnliche; dieses Serum war aus einem schon einige Tage alten, schlecht gerinnenden Plasma hergestellt und zeigte die beste Wirkung bei Verdünnung mit H_2O, während bei Serum I Verdünnung mit NaCl-Lösung die optimale Wirksamkeit ergab. Es bestehen hier je nach der Qualität des verwendeten Serums geringgradige Unterschiede, die erkennen lassen, daß bald eine energischere (Wasserzusatz), bald eine gelindere hydrolytische Einwirkung günstig ist.

Es wurde in der Einleitung dieses Abschnittes erwähnt, daß nach Entfernung der Globuline die Serozymwirkung an den Albuminen angetroffen wird. Das folgende Protokoll zeigt, daß es hierbei nicht gleichgültig ist, welche Mengenverhältnisse bei der Aufspaltung bestehen und daß je nach dem Grade der Verdünnung mit $^n/_{300}$-HCl bald eine beträchtliche Verbesserung, bald eine Verschlechterung im Serozymgehalt der Albuminfraktion erzielt wird.

Protokoll 11. Hammelserozym wird in der Menge von je 1,0 ccm versetzt mit 6, 8, 11, 15 ccm $^n/_{300}$-HCl. Nach 3 Stunden werden die an Menge und Konsistenz ziemlich ungleichen Globuline abzentrifugiert, mit 0,48, 0,64, 0,84, 1,2 ccm 10% NaCl isotonisch und mit Lauge gegen Lackmus neutral gemacht (1,0 ccm unbehandeltes Serum dient 5 bis 10fach verdünnt und mit Lackmus versetzt als Test für die Neutralisierung). Von diesen Röhrchen werden einander entsprechende Mengen (0,75, 1,0, 1,3, 1,65) abgefüllt, auf 1,5 mit phys. NaCl ergänzt und mit und ohne Cytozym auf Thrombinbildung geprüft. Im Protokoll wird ferner noch angeführt: ein Röhrchen, das während der gleichen Zeit 10fach mit Wasser verdünntes und hierauf auf 0,85% ausgesalzenes Serum enthält, ferner als Kontrolle das inzwischen konzentriert gestandene, erst bei Anstellung des Versuchs entsprechend verdünnte Serum. Ferner die in phys. NaCl entsprechend dem doppelten Volumen des ursprünglichen

Serums gelösten Globuline mit und ohne $CaCl_2$, sowie mit $CaCl_2$ + Cytozym, endlich bei Zusatz der zugehörigen Albumine.

	Verdünnung mit n/300-HCl			
	1 : 6	1 : 8	1 : 11	1 : 15
Albumin allein	fl.	fl.	fl.	fl.
„ + $CaCl_2$	13′	15′	36′	40′
„ + „ + Cytozym	3/4′	1 1/2′	20′	16′
Globulin allein	fl.	fl.	fl.	fl.
„ + $CaCl_2$	fl.	110′ ±	70′	40′
„ + „ + Cytozym	110′ ±	70′ ±	30′	3′
„ + „ + Serozym	14′	15′	33′	28′
Serum-Wasser + $CaCl_2$	30′	—	—	—
„ „ + „ + Cytozym	5′	—	—	—
Konz. Serum + $CaCl_2$	25′	—	—	—
„ „ + „ + Cytozym	10′	—	—	—

Am besten war die Serozymwirkung der Albumine bei Spaltung des Serums mit 6 Teilen n/300-HCl; bei Spaltung mit 11 bis 15 Teilen n/300-HCl ist die Serozymwirkung deutlich herabgesetzt, das Serum bildet dann weniger gut Thrombin als ungespaltenes oder mit Wasser gestandenes Serum. Von Interesse ist auch das Verhalten der Globuline: man sieht, daß dieselben um so mehr Serozym zu adsorbieren vermochten, je stärker die Verdünnung des Serums mit n/300-HCl war. Bei der 15 fachen Verdünnung ist die Serozymwirkung der Globuline ebenso stark wie diejenige der Albumine, sogar noch besser, während bei der Spaltung mit 6 fachem Volumen n/300-HCl die Globuline im Vergleich zu den Albuminen nahezu unwirksam sind[1]). Die Beobachtung der Wirksamkeit der Globuline zeigt somit, daß für die schlechtere Wirkung der Albumine bei zu reichlichem HCl-Zusatz nicht eigentlich eine Serozymschädigung, sondern bloß eine andere Verteilung desselben die Ursache ist.

Wesentlich ist die Tatsache, daß es gelingt, durch geeignete Verdünnung mit einem eine schwache Hydrolyse des Serums auslösenden Reagens (n/300-HCl) die Serozymwirkung desselben zu steigern.

Es war daher zu erwarten, daß andere Substanzen, die ebenfalls hydrolytische Eiweißspaltungen auslösen resp. fördern, auf die Serozymbildung von ähnlichem Einfluß sein würden. Als ein derartiger Körper, der nach den früheren Untersuchungen des einen von uns solche Spaltungen begünstigt, wurde ein gallensaures Alkali, glykocholsaures Natrium gewählt.

---

[1]) Für den Serologen dürfte dieser Befund darum von Interesse Wichtigkeit sein, weil ähnliche Verhältnisse auch für die Wirksamkeit des sogen. „Serumkomplementes“ von Bedeutung sind; wir beabsichtigen in einer späteren Arbeit darauf zurückzukommen.

Protokoll 12. Drei Hammeloxalatseren (Seren aus Oxalatplasmen) werden mit und ohne Zusatz von glykocholsaurem Na (1 %ige Lösung in Wasser, Präparat Merck) 1 bis 2 Tropfen zu der Mischung von 0,1 ccm Serum mit 0,9 ccm phys. NaCl 15 Min. digeriert und hierauf Fibrinogenlösung zugegeben.

	ohne Zusatz	Mit glykocholsaurem Na 1 Tropfen	2 Tropfen
Serum I + $CaCl_2$	7′	—	2½′
„ I + „ + Cytozym	1½′	—	1′
„ II + „	55′	6½′	7½′
„ III + „	10′	—	8′
„ III + „ + Cytozym	8′	—	2½′

Die begünstigende Wirkung des glykocholsauren Natriums ist bei allen drei Seren deutlich, namentlich aber bei Serum II, das von einem Tiere stammte, das fast konstant Serum mit relativ geringer Serozymwirkung lieferte, stärker hervorgetreten; es wurde durch Behandlung mit glykocholsaurem Na ebenso gerinnungsaktiv wie Serum I in unbehandeltem Zustande. Serum III war aus einem älteren, beim Rekalzifieren langsam gerinnenden Plasma, das erst durch gleichzeitige Einwirkung von glykocholsaurem Na und Cytozym stärkere Thrombinbildung gab.

Bei Zusätzen hydrolytisch wirkender Stoffe darf aber der Abbau nicht zu weit getrieben werden, da sonst eine Schädigung der Serozymwirkung zustande kommt; wird z. B. die Einwirkung längere Zeit ausgedehnt, so schlägt die ursprünglich fördernde in eine hemmende Wirkung um.

Protokoll 13. Gleiche Mengen von Ziegenoxalatserum werden mit verschiedenen Flüssigkeiten versetzt und die Wirksamkeit des Serozyms sofort, sowie an einigen folgenden Tagen bestimmt (die Röhrchen werden steril gemischt und bei 3° aufbewahrt). Zur Prüfung wird von der betreffenden Serumverdünnung entsprechend einem Gehalt von 0,1 ccm des ursprünglichen Serums (bei der ersten Bestimmung entsprechend 0,05 ccm) auf 1,5 ccm mit phys. NaCl ergänzt, 1 Tropfen $CaCl_2$ und sofort 1,0 ccm Fibrinogenlösung zugegeben.

Als Zusätze wurden verwendet:

Nr. 1: 1,5 Serum allein . . . . + 4 Tropfen $CaCl_2$
„ 2: 1,5 „ + 4,5 Wasser . . . . + 4 „ „
„ 3: 1,5 „ 9,0 „ . . . . + 4 „ „
„ 4: 1,5 „ 6,0 phys. NaCl . . . . + 4 „ „
„ 5: 1,5 „ 1,5 1 % glykochols. Na + 4,5 NaCl + 4 „ „
„ 6: 1,5 „ 6,0 7,0 % $NaHCO_3$ . . . . + 4 „ „

Die Proben Nr. 2 und 3 werden vor Zugabe des Fibrinogens isotonisch gemacht. Die verwendete Fibrinogen-Stammlösung war für den ganzen Versuch dieselbe in jeweils gleicher Verdünnung.

Dauer der Einwirkung	Gerinnungszeiten von Nr. 1	2	3	4	5	6
15 Minuten	8′	8′	5′	6′	1′	10′
24 Stunden	16′	13′	10′	10′	40′	3′
72 „	15′	30′	13′	11′	35′	6′
120 „	12′	32′	13′	11′	45′	20′

Die zuerst deutlich begünstigende Wirkung des glykocholsauren Natriums äußert sich nach 24 Stunden als eine ausgesprochene Hemmung (Nr. 5 zuerst 1 Min., später 40 Min., gegenüber Kontrolle 8 resp. 16 Min.); die Wirkung der Verdünnung mit Wasser und NaCl-Lösung (Nr. 2, 3, 4) ist nach 24 Stunden nur noch wenig ausgeprägt und verschwindet allmählich immer mehr. Überhaupt zeigen die späteren Prüfungen keine wesentlichen Verschiebungen mehr, nur eine langsame Abnahme der Serozymwirkung. Bloß Natriumbicarbonatzusatz (Nr. 6) zeigte das Optimum der Wirkung erst nach 24 Stunden und hielt das Serozym relativ länger bei höherer Aktivität.

Im vorhergehenden Versuche wurde wohl eine Schädigung, aber keine vollständige Zerstörung der Serozymwirkung durch zu weitgehende Hydrolyse bedingt. Wählt man aber Agenzien, welche die Aufspaltung von Eiweiß resp. seiner höheren Abbauprodukte rasch viel weiter führen, so schwindet die Serozymwirkung des Serums in kurzer Zeit vollständig dahin.

In dieser Weise wirkt Zusatz von Alkali ($^{n}/_{10}$-NaOH, ja sogar Carbonatalkalescenz zerstört, wie in der früheren Mitteilung gezeigt wurde, Serozym und Thrombin), ferner Säuren ($^{n}/_{10}$-HCl); auch die eiweißspaltenden Körper der Verdauungsdrüsen (Pepsin, Trypsin) wirken schädigend auf das Serozym, wobei von besonderem Interesse ist, daß das weniger tief abbauende Pepsin weniger abschwächt als das Trypsin, das, entsprechend seinem Vermögen, Eiweißkörper bis zu Aminosäuren zu spalten, das Serozym und selbst das im allgemeinen widerstandsfähigere Thrombin fast sofort unwirksam macht.

Protokoll 14. 1%ige Lösungen von Pepsin und Trypsin (Grübler),

mit Natriumbicarbonat neutralisiert, werden in der Dose 0,6 und 0,25 ccm mit je 0,05 ccm Hammeloxalatserum allein, sowie bei Anwesenheit von $CaCl_2$ (1 Tropfen), sowie von $CaCl_2$ + Cytozym (Leberlipoidemulsion, 1 Tropfen der Verdünnung $^1/_{40}$) 15 Min. stehen gelassen (Volumen durch Ergänzung mit physiol. NaCl jeweils 1,5 ccm). Hierauf erfolgt Zusatz von Fibrinogenlösung; in der zweiten Versuchshälfte wurde fertige Thrombinlösung (aus Serum 0,5 + NaCl 9,0 + $CaCl_2$ 0,5 + Cytozym 0,5) in der Dose von 0,75, 0,5 und 0,25 mit und ohne Zusatz von Pepsin und Trypsin auf Fibrinogenlösung geprüft.

	Pepsin		Trypsin		Kontrolle NaCl-Lösg.
	0,6	0,25	0,6	0,25	
Serum allein	fl.	fl.	fl.	fl.	fl.
„ + $CaCl_2$	60′	28′	fl.	fl.	15′
„ + $CaCl_2$ + Cytozym	60′	20′	fl.	fl.	8′
Thrombinlösung 0,75 . .	2′	—	fl.	—	2′
„ 0,50 . .	3′	—	fl.	—	2′
„ 0,25 . .	6′	—	fl.	—	$2^3/_4$′

Wir sehen somit, daß Trypsin sowohl das Serozym wie das bereits gebildete Thrombin in seiner Wirkung vollständig aufhebt. Pepsin wirkt zwar deutlich schädigend, läßt aber doch noch eine gewisse Serozymwirkung durchdringen; fertiges Thrombin wird in relativ geringem Maße angegriffen.

Auf einige andere, ähnlich wirkende Körper, wie Cobragift, Hirudin, wird später näher eingegangen. Ob und inwieweit die angegebene Hemmung des Trypsins usw. sich auch gegen das Fibrinogen richtet und dessen Fällbarkeit durch Abbau herabsetzt, kann nicht leicht entschieden werden, da diese Stoffe, einmal zugesetzt, nicht mehr neutralisiert werden können.

Im vorhergehenden wurden die Eigenschaften des „Serozyms“ näher untersucht. Es erhebt sich nunmehr die Frage, ob sich die Substanzen, an welche die Serozymwirkung gebunden ist, chemisch näher charakterisieren lassen.

Wir haben zunächst eine Reihe verschiedener Eiweißkörper, die nach den üblichen Darstellungsmethoden möglichst „rein“ erhalten worden waren, auf serozymartige Wirkung geprüft.

In dieser Richtung wurden untersucht:

A. Globuline: aus Blutserum,
„ Eiereiweiß;
ferner Legumin, Vitellin, Edestin.

B. Albumine: aus Serum,
„ Eiereiweiß.

C. Ein Glykoproteid: Casein.

D. Nucleoproteide: Nuclein. puriss. Merck;
ein aus Thymus des Kalbes von uns selbst hergestelltes Nucleinpräparat.

E. Schließlich wurde noch nucleinsaures Natrium aus Hefe (Merck) als 1 %ige Lösung in physiologischer NaCl geprüft.

Die Eiweißkörper wurden meist in 0,5 bis 1 %iger $NaHCO_3$-Lösung gelöst und davon fallende Mengen unter Zusatz von 1 bis 2 Tropfen 1 %iger $CaCl_2$-Lösung mit Fibrinogen stehen gelassen. Die Kontrolle erhielt die gleichen Mengen reiner Bicarbonatlösung und denselben $CaCl_2$-Zusatz. Die Globuline gaben hierbei eher eine Hemmung der Fibrinfällung (die S. 66 erwähnten geringfügigen Flockungen, welche die Kontrollen nach längerem Stehen aufwiesen, blieben aus) ebenso Casein Nuclein und nucleinsaures Natrium wurden auch in Kombination mit wechselnden Mengen von Eieralbumin geprüft, gleichfalls ohne Erfolg.

Das aus Kalbsthymus gewonnene Nuclein war zuerst durch bloßes Zerreiben blutfreier Organstückchen in gesättigter NaCl-Lösung, Zentrifugieren und Lösen des Bodensatzes in 1 %iger Bicarbonatlösung und nochmaliges Zentrifugieren gewonnen worden. Der Abguß war in Dosen von 0,1 bis 0,05 ccm mit Kalk allein nicht wirksam; mit Serozym und Kalk zusammen trat aber schon in Dosen von 0,005 bis 0,01 ccm sehr schnelle Gerinnung ein, ein Beweis, daß es sich hier wohl um eine Cytozymwirkung handelte. Wir haben daher ein zweites Präparat in der Weise dargestellt, daß die Thymus zuerst getrocknet, fein zerrieben, das Pulver mit Alkohol und Äther extrahiert und in 1 % $NaHCO_3$ gelöst wurde. Das so erhaltene Nuclein hatte seinen Cytozymcharakter verloren, wies aber ebenfalls keine Serozymwirkung auf.

Aus allen diesen Substanzen konnte somit eine irgendwie deutliche Serozymwirkung, d. h. das Vermögen, zusammen mit $CaCl_2$ (eventuell unter Zusatz von Cytozym) Fibrinogenlösungen auszufällen, nicht beobachtet werden.

Hingegen haben wir wiederholt an Eiereiweiß schwache, aber unzweifelhafte Serozymeigenschaften beobachtet.

Protokoll 15. Zwei frische Hühnereier werden so geöffnet, daß ein Teil des Eiweißes ohne Beimengung von Eigelb aufgefangen wird; das Eiweiß wird mit dem 9fachen Volumen physiol. NaCl-Lösung geschüttelt und durch Watte filtriert. Von der klaren Lösung werden 2,0 ccm mit 0,5 ccm einer 1 %igen Lösung von glykocholsaurem Natrium, ein zweites Röhrchen mit 0,5 ccm physiol. NaCl für 14 Stunden in den

Brutschrank gestellt (unter Toluol), hierauf je 0,5 ccm mit $CaCl_2$- resp. Cytozymzusatz (auf 1,5 ccm mit NaCl ergänzt) gegenüber Fibrinogen geprüft.

			Mit $CaCl_2$	Mit $CaCl_2$ + Cytozym
Ei I	mit glykocholsaur. Na		8 St. netzig geronnen	5 St. netzig
„	ohne	„	8 „ wenig Flocken	5 „ mehr netzig
Ei II	mit	„	8 „ netzig geronnen	5 „ fest
„	ohne	„	8 „ flockig. Bodensatz	5 „ netzig
Kontrolle	mit	„	20 „ klar	20 „ klar
	ohne	„	20 „ „	20 „ „

Ohne Kalkzusatz war eine Wirkung nicht erkennbar. Mit Serozym auf evtl. Cytozymcharakter geprüft, zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede gegenüber der Kontrolle. (Eigelb hat dagegen ausgesprochene Cytozymwirkung.)

Das Protokoll zeigt, daß Eiereiweiß nach geeigneter Verdünnung und namentlich nach Vorbehandlung mit glykocholsaurem Natrium bei Gegenwart von $CaCl_2$ Fibrinogenlösungen zur Gerinnung zu bringen vermag.

Auch an menschlichem Speichel haben wir eine ähnliche nicht sehr starke Serozymwirkung nachweisen können. Da Mundspeichel schon an sich reich an Kalksalzen ist, ist für den Nachweis seiner Gerinnungsaktivität kein weiterer Kalkzusatz erforderlich. Mit Dosen von 0,3 bis 0,5 haben wir in der Regel Gerinnung von Fibrinogenlösung nach 20 bis 40 Min. erhalten; Cytozymzusatz war hierbei nicht beschleunigend[1]). Nach Erhitzen auf 56° ging diese Wirkung verloren.

Aus den vorhergehenden Untersuchungen dürfte hervorgehen, daß die im ersten Abschnitt aufgestellte Behauptung, die Serozymwirkung werde von gewissen Abbauprodukten ausgeübt, berechtigt ist. Die Labilität dieser Serumfunktion sowie die Möglichkeit, dieselbe durch verschiedene, die Hydrolyse befördernde Eingriffe oder Zusätze zu verstärken, während zu weit gehender Abbau schädigend wirkt, weist auf ein wahrscheinlich zu den Polypeptiden zu stellendes Abbauprodukt hin, das bei der Serozym- resp. Thrombinbildung aus den Serumeiweißkörpern entsteht.

---

[1]) Ein für die Theorie der Cytozymwirkung (s. u.) nicht uninteressantes Detail, welches zeigt, daß die fällenden Ca-Verbindungen schon fertig im Speichel vorhanden sind, nicht erst (wie im Serum) durch Hydrolyse freigemacht werden müssen.

Wir haben versucht, ob eine Isolierung dieser, die Serozymwirkung ausübenden Abbauprodukte aus dem Serum gelingt, und haben hierzu die schon oben erwähnte Methode der Alkoholfällung benutzt[1]). Es ist uns nicht gelungen, auf diesem Wege eine Lösung von bloßen Abbauprodukten zu erzielen, die schon allein Serozymwirkung ausgeübt hätten. Da aber die diesbezüglichen Versuche einige gerinnungsphysiologisch interessante Befunde ergeben haben, sei hier etwas näher auf dieselben eingegangen.

Die Methode der Isolierung gewisser, tieferer (vielleicht noch polypeptidartiger) Abbauprodukte aus Seren besteht darin, daß 1 Teil Serum mit 5 Teilen absoluten Alkohols gut vermischt, einige Stunden stehen gelassen, dann filtriert wird. Die alkoholische Lösung, welche solche Abbauprodukte der Serumeiweiße und auch Cytozyme enthält, wird durch Destillation vom Alkohol befreit, der Rückstand eingetrocknet und wiederholt mit Äther digeriert, um die Lipoidcytozyme zu entfernen. Der so erhaltene Rückstand wird in Wasser gelöst und auf das ursprüngliche Serumvolumen gebracht[2]).

Wir möchten dieses Verfahren, das viel brauchbarere Resultate zu liefern scheint als die bisher meist angewendete Dialysiermethode, auch für andere physiologische Untersuchungen empfehlen, bei denen es darauf ankommt, tiefere Eiweißabbauprodukte vom kolloidalen Eiweiß ohne besondere Eingriffe zu trennen und quantitativ zu bestimmen.

Durch die Behandlung mit Alkohol wird das Serum in zwei Fraktionen geschieden, die alkohollösliche, welche die tieferen Abbauprodukte, Lipoide und Salze enthält, und die durch Alkohol gefällte, hauptsächlich aus Eiweißkörpern und peptonartigen Stoffen bestehende Fraktion. Untersucht man die alkoholische Fraktion aus verschiedenen Seren mit der

---

[1]) Die von Bordet angegebene Methode der Adsorption an Kalkphosphatniederschläge schien uns, da hieran auch andere Stoffe und Eiweiß selbst adsorbiert werden können, für unsere Zwecke nicht geeignet.

[2]) Dieser enthält neben dem koagulierten Eiweiß noch höhere, Albumosen- oder Pepton-ähnliche, alkoholfällbare Abbauprodukte, die durch ihre Löslichkeit in Wasser oder NaCl-Lösung die teilweise Wiederauflösung des Koagulums ermöglichen.

Technik der Gerinnungsphysiologie, so ergibt sich, daß dieselbe stets deutliche Cytozymwirkung ausübt, d. h. die Thrombinbildung in serozymhaltigen Seren wesentlich beschleunigt; diese Eigenschaft findet sich auch dann in diesen Lösungen, wenn die beigemischten Lipoide durch Ätherextraktion entfernt werden. Es geht daraus hervor, daß es cytozymartige Stoffe gibt, die sicher nicht zu den Lipoiden gehören, sondern höchstwahrscheinlich gewisse Eiweißabbauprodukte sind. Derartige Stoffe finden sich in allen Seren, auch in den mit allen Kautelen zellfrei gewonnenen Plasmen und daraus stammenden Seren, so daß der Schluß erlaubt scheint, daß diese wasserlöslichen Cytozyme schon im strömenden Blute vorkommen. Serozymwirkung, d. h. das Vermögen, mit Kalk zusammen Fibrinogen auszufällen, war an diesen Abbauprodukten nicht nachweisbar.

Die Eiweißfraktion des mit Alkohol gefällten Serums ist, da der größte Teil der Abbauprodukte entfernt ist, fast unlöslich in NaCl-Lösung. Durch Pulverisieren und längeres Stehen in physiol. NaCl-Lösung gelingt es gleichwohl, etwas von dem Niederschlag in kolloidale Lösung zu bringen. Derartige Lösungen zeigen nun je nach dem Ausgangsmaterial serozym- oder thrombinartige Wirkung, wie das folgende Protokoll zeigt. Von Interesse hierbei ist, daß die Serozymwirkung (falls eine solche vorhanden ist) durch Zusatz der zweiten, alkohollöslichen Komponente sehr verstärkt wird.

Protokoll 16. Mehrere Seren werden in der Menge von 3,0 mit 50 ccm absol. Alkohol vermischt, mehrmals aufgekocht und hierauf vom Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wird eingetrocknet, mit Äther extrahiert und in 3,0 Wasser gelöst (Alkoholfraktion). Das auf dem Filter zurückgebliebene Eiweißkoagulum wird nach Verdunsten des Alkohols in einer Reibschale pulverisiert und je 0,05 g mit 5,0 NaCl-Lösung wiederholt geschüttelt und dann 16 St. im Kühlraum stehen gelassen. Hierauf wird durch Watte filtriert (Eiweißfraktion). Die Seren stammen: Nr. 1 aus Hammeloxalatplasma, durch Recalcifieren gewonnen; Nr. 2 und 3 normale Menschenseren, aus Gesamtblut durch spontane Gerinnung erhalten.

Prüfung der Alkoholfraktion auf Serozym- resp. Cytozymcharakter.

a) Auf Serozym: Je 0,3 der oben erwähnten Lösung werden geprüft mit Fibrinogen allein, ferner unter Zusatz von 0,3 $CaCl_2$-Lösung sowie von 0,2 Cytozym (Leberlipoid) + 0,3 $CaCl_2$.

b) Auf Cytozym: Je 1 Tropfen eines Hammelserums (aus Oxalatplasma) + 1,0 NaCl + 0,1 $CaCl_2$ + fallende Mengen der Alkoholfraktion; nach 5 Min. 1,0 Fibrinogenlösung.

a)

Zusatz	Alkoholfraktion			Kontrolle (NaCl-Lösung)
	1	2	3	
0	fl.	fl.	fl.	fl.
0,3 $CaCl_2$	fl.	fl.	fl.	fl.
0,3 $CaCl_2$ + 0,2 Cytozym	M. Spur Gerinnsel	M. Spur Gerinnsel	M. Spur Gerinnsel	M. Spur Gerinnsel

b)

Menge der Alkoholfraktion	Serum				Kontrolle
	1	2	3	3a	
0,3	6′	4′	2¼′	3½′	15′
0,1	12′	7′	6′	7′	—
0,025	15′	12′	12′	13′	—

3a bedeutet Alkoholfraktion von Serum 3 nach 1 St. Erhitzen auf 56°.

c) Prüfung der Eiweißfraktionen dieser Seren: Je 0,5 der wie oben angegeben dargestellten Lösungen werden mit 0,5 NaCl-Lösung versetzt, oder mit 0,3 $CaCl_2$-Lösung, oder mit 0,3 $CaCl_2$ + 0,2 Cytozymemulsion, oder mit 0,3 $CaCl_2$ + 0,3 der entsprechenden Alkoholfraktion; ferner mit 1,0 Fibrinogenlösung.

Zusatz	Alkoholfällung aus Serum			Kontrolle
	1	2	3	
Nur NaCl-Lösung	3—4 St.	100′	120′	fl.
$CaCl_2$	10′	40′	50′	fl.
$CaCl_2$ + Cytozym	2½′	40′	50′	fl.
$CaCl_2$ + Alkoholfraktion .	2′	35′	25′	—

d) Prüfung des Serozymgehaltes der drei Seren: Je 0,1 + 1,0 NaCl, ferner mit 0,1 $CaCl_2$ resp. $CaCl_2$ + Cytozym.

Zusatz	Serum		
	1	2	3
0	10 St.	90′	80′
$CaCl_2$	11′	45′	30′
$CaCl_2$ + Cytozym . .	1′	45′	25′

Protokoll a) zeigt keinen Einfluß auf die Fibrinogenlösung, selbst bei Zugabe von Cytozym; es ist somit nicht gelungen, das Serozym in noch wirksamer Form durch Alkohol zu extrahieren, obwohl von den hierzu verwendeten Seren Nr. 1 starken Serozymgehalt besaß [Prot. d)].

Hingegen ergaben die Alkoholfraktionen durchgehends eine deutliche Beschleunigung der mit Serozym hervorrufbaren Gerinnung [Prot. b)]; diese Wirkung ist thermostabil. Die Alkoholfällung enthält Körper adsorbiert, die serozymartige Eigenschaften haben, d. h. Abbauprodukte, die mit $CaCl_2$ fällende Salzverbindungen liefern. Der Gehalt an diesen Stoffen ist demjenigen des verwendeten Serums proportional; in serozymarmen Seren ist er sehr gering, ja hier sind oft überhaupt nur Abbauprodukte, die schon mit Kalk versehen sind (Thrombin) nachweisbar. (Mit diesen identisch ist auch das „Schmidtsche Thrombin", nach den Angaben des Autors aus Rinderserum durch Alkoholfällung hergestellt.) Serozymreiche Seren (Nr. 1) ergeben hingegen auch ziemlich gut als Serozym wirksame Fällungen. Zum Teil dürfte es sich hierbei um Abbauprodukte handeln, die erst im Laufe der sehr langsam und nur teilweise erfolgenden Lösung des Eiweißniederschlages durch allmähliche Hydrolyse frei werden. Für diese Annahme spricht auch die vorzügliche Wirkung des Zusatzes der alkohollöslichen Abbauprodukte desselben Serums, also von Stoffen, die die hydrolytischen Spaltungen begünstigen.

Es scheint uns von Interesse, daß es durch Vereinigung beider Fraktionen gelingt, eine weitaus bessere Thrombinwirkung zu erzielen, als es bei der Verwendung derselben Menge ungespaltenen Serums (und bloßen $CaCl_2 + NaCl$-Zusatz) möglich ist, obwohl nur ein kleiner Teil der Eiweißfällung des Serums in Lösung geht; ein Beweis, daß es sich nicht wohl um einen schon im Serum vorhandenen, sondern um einen durch Abbau neu entstehenden Körper handelt.

Daß es nicht möglich ist, an den aus serozymhaltigen Seren isolierten Abbauprodukten Serozymwirkung nachzuweisen, kann vielleicht an der Labilität dieser Verbindungen liegen, derzufolge sie in wäßriger Lösung (beim Abdestillieren des Alkohols, Eintrocknen) namentlich bei Gegenwart von anderen niederen Abbauprodukten leicht zerfallen dürften. Andererseits könnte die Tatsache, daß man bei der Alkoholfällung die serozymartig wirkenden Stoffe am Eiweißniederschlag nachweisen kann, darin ihre Erklärung finden, daß dieselben höhere, poly-peptidartige und daher alkoholfällbare Abbauprodukte sind Wir finden daher Serozym und Thrombin bei Alkoholfällungen von Seren am Eiweißniederschlag, ähnlich wie bei der Thrombingerinnung von Plasmen an den Fibringerinnseln (von wo sie durch Wiederauflösung des Koagulums durch Autolyse wieder frei werden können: Nolfs „Thrombinlösung").

Die „Cytozym"-Komponente.

Nach den bisherigen Vorstellungen über die Thrombinbildung ist außer dem Serozym und Kalksalzen noch ein dritter Faktor für das Zustandekommen der Gerinnung notwendig oder doch von wesentlichem Einfluß[1]); als solche wurden von einzelnen Forschern untereinander sehr verschiedene Stoffe beschrieben und mit entsprechenden Namen bezeichnet (Zymoplastische Substanzen nach A. Schmidt, Thrombokinase nach Morawitz, Cytozym nach Fuld und Spiro, Bordet und Delange, Thrombozym nach Nolf usw.).

Einige Autoren sind der Ansicht, daß es sich hierbei um lipoidartige Substanzen handeln dürfte (alkoholische Organextrakte nach Wooldridge und A. Schmidt, Lipoide der Lecithingruppe nach Bordet und Delange, Zak u. a.), während andere (Morawitz, Fuld und Spiro, Nolf) eiweißartigen Stoffen des Zellplasmas diese Wirkung zuschreiben. Nolf hat die Lipoidemulsionen bloß als „thromboplastische Substanzen" neben dem an der Bildung des Thrombins aktiv beteiligten Thrombozym gelten lassen.

Wir verstehen im folgenden unter „Cytozym" ganz allgemein Stoffe, die in serozymhaltigen Seren eine Steigerung ihrer Thrombinwirkung hervorrufen, während sie allein (bei Kalkzusatz ohne Serozym) Fibrinogen nicht wesentlich beeinflussen.

Wir haben im Laufe unserer Untersuchungen über das Serozym gesehen, daß verschiedene Stoffe oder Zusätze, welche die Hydrolyse eines Serums erhöhen, dessen Thrombinwirkung steigern (Verdünnung mit Wasser, $^{n}/_{800}$-HCl, ferner gallensaure Alkalien usw.). Bekannt ist ferner, daß die Glaswand von Gefäßen oder adsorbierende Pulver (Glaspulver, Kaolin u. a.) die Gerinnung befördern; noch stärker wirken kolloidal verteilte Lipoidemulsionen, also eine Reihe von Körpern, die adsorptionsfähige Oberflächen aufweisen. Daß aber andererseits derartige Oberflächen und eine mehr oder weniger feine kolloidale Sus-

[1]) Pekelharing hat die Ansicht ausgesprochen, daß die Cytozyme nicht eigentlich zur Gerinnung notwendig seien, da auch mit Petroläther phosphatidfrei gemachte Plasmen gerinnen. Zur Erklärung der fördernden Wirkung nimmt er eine Neutralisation hemmender Stoffe durch Lecithin usw. an, ohne daß er diese Annahme genügend stützen könnte.

pension für eine cytozymartige Wirkung nicht allein maßgebend sind, zeigt die Tatsache, daß auch wasserlösliche Eiweißabbauprodukte, also echte und vollständig klare Lösungen, ausgesprochenen Cytozymcharakter aufweisen können, während andererseits nicht alle kolloidal verteilten Stoffe als Cytozyme wirken (z. B. Cholesterinemulsionen usw.).

Wenn wir die ihrer Natur nach recht verschiedenen Körper, an denen cytozymartige Wirkungen nachweisbar sind, nach einheitlichen Gesichtspunkten ordnen, so lassen sich drei Hauptgruppen derselben unterscheiden:

1. Körper, die durch ihre Oberfläche wirken (thromboplastische Substanzen).

2. Rein chemisch wirkende Stoffe, die als Abbauprodukte ihrerseits abbauend wirken[1]).

3. Körper, die beide Eigenschaften vereinigen, d. h. sowohl infolge ihrer physikalischen wie chemischen Beschaffenheit die Thrombinbildung beeinflussen.

Wir möchten aber sofort betonen, daß wir allen diesen Stoffen, gleichgültig welcher Gruppe sie angehören, **im wesentlichen** eine ähnliche Wirkungsweise zuschreiben, nämlich die, eine vermehrte Bildung von serozymartigen Abbauprodukten im Serum hervorzurufen, dadurch, daß sie die Hydrolyse begünstigen.

Die in Gruppe 1 gehörigen Körper, für die wir den von Nolf eingeführten, von diesem Autor allerdings anders verwendeten Namen[2]) der „thromboplastischen Substanzen“ beibehalten möchten, wirken zufolge ihrer gut adsorbierenden Oberflächen. Es ist bekannt, daß Kaolin, Kieselgur usw. aus

[1]) Siehe die von E. Herzfeld entwickelte Theorie über Lösung und Fällung der Eiweißkörper, diese Zeitschr. 70, 262, 1915.

[2]) Die Unhaltbarkeit der von Nolf gegebenen Theorie der Gerinnung zeigt sich auch in der nach diesem Autor ganz unklar bleibenden Wirkungsart der gerinnungsfördernden Faktoren. Nicht nur die verschiedenen Cytozyme, wie Pulver, Lipoidemulsionen usw., sondern auch Zusatz von bloßem Wasser faßt dieser Autor unter den Begriff der thromboplastischen Wirkung zusammen; in einer seiner letzten Arbeiten wird selbst das Thrombin als thromboplastische Substanz aufgefaßt, das seinerseits zu vermehrter Thrombinbildung anrege. Wir haben eine autokatalytische Beschleunigung der Thrombinbildung bisher experimentell nicht bestätigen können.

Lösungen vornehmlich kolloidale Bestandteile an sich reißen (Entfärben mit Tierkohle, Klären mit Kieselgur usw.).

Hierdurch werden Eiweißlösungen nicht nur ärmer an kolloidalem Eiweiß, sondern es wird auch ein Teil der von letzterem adsorbierten Abbauprodukte aus der Lösung entfernt; so wird die Möglichkeit gegeben, daß eine weitere Hydrolyse einsetzt (bekanntlich begünstigt der Zusatz solcher adsorbierenden Stoffe die Autolyse in Seren), und serozymartige Abbauprodukte entstehen. Andererseits dürfte ein Teil der günstigen Wirkung der thromboplastischen Substanzen auf Entfernung von hemmenden, d. h. die Löslichkeit des Fibrins erhöhenden Abbauprodukten durch die Adsorption an diese Körper beruhen. Nur so ist es möglich, daß diese Zusätze gelegentlich ebenso gut wirken wie eigentliche Cytozyme, während ihre hydrolytische Wirkung hinter derjenigen der in Gruppe 2 und 3 zusammengefaßten Stoffe in der Regel weit zurücksteht.

Die in der Literatur häufig ausgesprochene Ansicht, wonach diese Körper dadurch wirken sollen, daß sie als feste Partikelchen Zentren für die Gerinnung abgeben, an denen sich die ersten Fibrinfäden ansetzen (ähnliches wurde auch von den Blutplättchen und Blutzellen behauptet), können wir nicht teilen; wenn sie überhaupt zutrifft, so könnte sie höchstens eine ganz untergeordnete Rolle spielen. Vergleicht man nämlich die Gerinnung von Röhrchen, in denen derartige Partikelchen, wie Kaolin, Kohle, Ca-Oxalatniederschlag usw. suspendiert wurden, mit solchen, wo die Koagulation ohne die geringste Trübung des Mediums vor sich geht, so findet man häufig keinen Unterschied in der Gerinnungsdauer, nur die Festigkeit des Koagulums ist begreiflicherweise bei Einschluß fester Teilchen eine größere. Sehr stark adsorbierende Stoffe, wie Kohle oder Kaolin, können unter Umständen sogar direkt ungünstig wirken, da sie auch das Fibrinogen adsorbieren und daher fetzig ausfallen, so daß eine regelrechte Gerinnung verhindert wird.

Gruppe 2. Hierher gehören die verschiedenen aus Blut oder Organen mit Wasser oder Alkohol usw. extrahierbaren, wasserlöslichen Abbauprodukte von Eiweißkörpern; in Abwesenheit von Eiweiß sind dieselben thermostabil; mit hitzekoagulierbaren Körpern zusammen erhitzt, geht die Wirkung solcher Extrakte meist mehr oder weniger verloren, weshalb von manchen Forschern eine „Ferment“natur derselben angenommen wurde. Wir sind vielmehr der Ansicht, daß die Inaktivierung infolge der Zustandsänderung der Kolloide und zu weitgehender Hydrolyse der Eiweißabbauprodukte bei 56° eintritt.

Auch viele chemisch reine Körper, wie Aminosäuren und Polypeptide, gehören hierher, wie dies namentlich von Zuntz und György in ihren eingehenden Studien dieser Frage festgestellt wurde[1]).

Gruppe 3. Hierher sind in erster Linie wäßrige Emulsionen von Lipoiden, wie sie nach Extraktion verschiedener Organe mit Alkohol erhalten werden, ferner einige Seifen (ölsaures Natrium) usw. zu stellen. Als sehr feine Emulsionen (sie sind meist koktostabil, aber nicht sehr haltbar) könnten sie durch Oberflächenwirkungen eine Rolle spielen. Sicher ist aber auch, daß die chemische Beschaffenheit der Körper dieser Gruppe von Bedeutung ist. Denn wir sehen bei manchen derselben nicht nur eine gegenüber den bloß adsorbierenden Stoffen unvergleichlich größere Wirksamkeit, sondern auch eine große Verschiedenheit unter den einzelnen Lipoidextrakten, die ja nach der Natur des Ausgangsmaterials, nach der Extraktionsart usw. sehr ungleich aktiv sind. Für die Annahme, daß auch diese Stoffe durch vermehrte Hydrolyse und somit durch gesteigerte Serozymbildung wirken, spricht der Befund eines größeren Gehaltes mit Ninhydrin reagierender Stoffe in Seren, die einige Zeit mit denselben bei Anwesenheit von Kalk digeriert werden. (Bestimmung in der alkohollöslichen Fraktion nach der oben beschriebenen Methode.) Auf welche Weise aber die Abbauvorgänge hierbei zustande kommen, ob die Lipoidteilchen mit Abbauprodukten Bindungen eingehen oder gewisse Stoffe elektiv adsorbieren, ferner wieweit die jeweilige Wirkung nicht dem Lipoid als solchem, sondern anhaftenden Verunreinigungen mit Eiweißabbauprodukten zuzuschreiben ist, bedarf noch eingehenderer Untersuchung. (Tatsächlich lassen sich solche Abbauprodukte in Lipoidextraktemulsionen bei der Dialyse in calorimetrisch meßbaren Mengen nachweisen). Von Interesse für diese Frage ist jedenfalls, daß die Wirksamkeit der Organlipoide bei dem Versuch, sie möglichst rein darzustellen, wesentlich abnimmt (Bordet und Delange).

---

[1]) Diese Autoren fanden u. a., daß die Wirkung der aktiv befundenen Abbauprodukte dann am besten zum Vorschein kommt, wenn dieselben einige Zeit mit dem Serozymserum digeriert werden, ferner, daß zu große Dosen wieder hemmen. Beides Befunde, die für die von uns angenommene Hydrolyse als Ursache der günstigen Wirkung sprechen.

Wir führen als Beispiel für gewisse Unterschiede, die zwischen den thromboplastischen Substanzen und den Cytozymen im engeren Sinne bestehen, folgende zwei Versuche an:

Protokoll 17. Eine Cytozymemulsion von Leberlipoiden und eine Kaolinsuspension, beide in phys. NaCl-Lösung, werden auf gerinnungsbefördernde Wirkung geprüft: 1. mit einem sog. metastabilen Kaninchenplasma, 2. mit der gewöhnlich verwendeten Hammelserozymlösung.

1. Das durch Auffangen des Blutes im paraffinierten Gefäß, rasches Abkühlen und längeres Zentrifugieren erhaltene Plasma wird in der Menge von je 1,0 in drei Röhrchen verteilt. Röhrchen 1 erhält als weiteren Zusatz nur 0,2 physiol. NaCl-Lösung und gerinnt nach 16 Min. Röhrchen 2 erhält 0,2 der Cytozym-, Röhrchen 3 ebensoviel der Kaolinemulsion; beide gerinnen nach 2 Min.

2. In drei Röhrchen kommt je 1,0 NaCl-Lösung + je 1 Tropfen Serozym + 2 Tropfen $CaCl_2$-Lösung, ferner in Röhrchen 1 0,2 NaCl-Lösung, Röhrchen 2 0,2 Cytozym-, Röhrchen 3 0,2 Kaolinsuspension. Nachdem die drei Röhrchen 10 Min. gestanden haben, wird je 1,0 Fibrinogenlösung zugesetzt; Nr. 1 gerinnt nach 18 Min., Nr. 2 nach $1^1/_2$ Min., Nr. 3 mehr netzig unvollständig nach 20 Min.

Wir sehen somit denselben Stoff, Kaolin, einmal sehr aktiv, das andere Mal ganz unwirksam, ja geradezu hemmend. Nach dem ersten Versuche könnte man geneigt sein, das Kaolin auf eine Stufe mit dem Leberlipoid zu stellen und beiden eine identische Wirkung zuzuschreiben. Nach dem zweiten Versuch müßte dagegen das Kaolin als ganz unwirksam, wenn nicht als hemmend bezeichnet werden. Das ungleiche Ergebnis erklärt sich aber dadurch, daß das Kaolin im Plasma, wo (im paraffinierten Glas) die Bedingungen für eine Serozymentstehung sehr ungünstige sind, zu einer Bildung solcher Abbauprodukte Anlaß gibt, daneben wahrscheinlich durch Adsorption anderer Stoffe die Gerinnbarkeit des Milieus steigert. Im zweiten Falle sind dagegen schon relativ gute Bedingungen für eine Serozymbildung gegeben (Verdünnung, Glaswand), ein schwach hydrolytisch wirkender Stoff kann daher keine wesentliche Steigerung mehr erzeugen, ja die Gerinnung wird sogar durch Adsorption von Serozym und Fibrinogen erschwert. Während kräftig auf die Serozymbildung wirkende Stoffe, wie Lipoidemulsionen, in beiden Fällen eine starke Thrombinbildung bewirken.

Auf Grund der vorhergehenden Untersuchungen gelangen wir zu folgender Auffassung des Gerinnungsvorganges: Das Wesentliche bei der Thrombinbildung ist die Entstehung und genügende Anwesenheit von $CaCl_2$-Serozym, d. h. $CaCl_2$-Salzverbindungen gewisser Abbauprodukte. Die Cytozyme (im weitesten Sinne) wirken dadurch, daß sie die Bildung solcher Abbauprodukte steigern.

Es erhebt sich daher zunächst die Frage, ob das unter Anwesenheit von Cytozym entstandene „Thrombin" tatsächlich nichts anderes als Serozym ist und ob nur eine quantitative und nicht doch auch eine qualitative Veränderung desselben bei der Thrombinbildung anzunehmen ist?

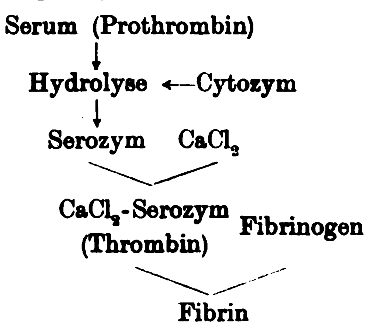
Es sei hier zunächst die Tatsache angeführt, daß mit $CaCl_2$ versetztes möglichst reines „Serozym" eine Fibrinogenlösung nie vor einer relativ längeren Reaktionszeit (im günstigsten Fall etwa 6 bis 10 Min.) zur Gerinnung bringt, während gute Thrombinlösungen dies schon nach 50 bis 60 Sekunden bewirken. Die Gerinnungsdauer kann bei bloßer Verwendung von Serozym, d. h. serozymhaltigem Serum, nicht unter diese Grenze gebracht werden. Vermehrter Kalkzusatz ist belanglos; erhöht man die Menge des Serums, so wird im Gegenteil sehr bald eine Verzögerung der Gerinnung beobachtet. Alles weist darauf hin, daß bei einer gegebenen Verdünnung im Serum nur eine beschränkte Menge Serozym frei wird, worauf ein Gleichgewicht eintritt und keine weitere Hydrolyse stattfindet. Wird stärker verdünnt, so kann zwar durch weitere Hydrolyse etwas mehr Serozym frei werden, die gleichzeitige Verdünnung macht dies aber illusorisch; während bei Verwendung von konzentrierterem Serum die Hydrolyse geradezu vermindert sein muß. Das vorhandene Serozym geht bei Anwesenheit von $CaCl_2$ in die wirksame Salzverbindung über, bleibt aber in einer Konzentration, die eine sofortige Gerinnung von zugesetztem Fibrinogen nicht ermöglicht. Sowie wir in eine derartige Serozymlösung ein gut wirksames Cytozym bringen, also einen Stoff der Gruppe 2 oder 3, so setzt eine Steigerung der Serozymbildung ein, wobei die Gegenwart genügender $CaCl_2$-Mengen von größter Bedeutung ist. Es zeigt sich nämlich, daß Serozym und Cytozym bei Fehlen von $CaCl_2$ nicht aufeinander einwirken, eine längere Zeit gestandene Mischung beider Stoffe sich vielmehr wie eine ent-

sprechende frischbereitete verhält. Diese Tatsache weist darauf hin, daß die unter dem Einfluß des Cytozyms entstehenden serozymartigen Abbauprodukte stets sofort in $CaCl_2$-Verbindungen umgewandelt werden müssen, wodurch die Bedingungen für weitere Hydrolyse und neue Serozymbildung durch das Cytozym gegeben sind. So kommt eine wesentlich höhere Konzentration von $CaCl_2$-Serozym zustande, als sie bei Fehlen eines hydrolytisch wirkenden Agens möglich wäre, und dadurch dürfte sich die hohe Wirksamkeit des Thrombins im Gegensatz zum bloßen, d. h. ohne Cytozym entstandenen $CaCl_2$-Serozym erklären. Diese Hydrolyse verlangt einige Zeit (die Dauer der Thrombinbildung bei Gerinnungsversuchen), bis die maximale Menge wirksamer Abbauprodukte entstanden ist. Hierauf bleibt die Lösung einige Zeit aktiv, um bald rascher, bald langsamer wieder an Wirksamkeit einzubüßen (s. Prot. 20 und 21; vgl. ferner das über den „Serozmygehalt“ der bei Cytozymanwesenheit geronnenen Seren Gesagte). Worauf diese Abnahme der Aktivität beruht, muß vorläufig als unentschieden gelten. Man könnte daran denken, daß das Serozym trotz seiner Bindung an $CaCl_2$ schließlich doch einer zu weitgehenden Hydrolyse verfällt. Die bekannte Tatsache, daß inaktiv gewordene Seren (durch die hypothetische Umwandlung des Thrombins in „Metathrombin“) nach kurzer Behandlung mit Alkali oder Säure, also mit hydrolytisch wirkenden Agentien, wieder thrombinhaltig werden, ließ allerdings annehmen, daß sich vielleicht das Thrombin beim Stehen des Serums mit anderen Abbauprodukten synthetisiert und so höhere Verbindungen entstehen, die durch Lauge usw. wieder in die wirksamen Bestandteile aufgespalten werden. Wahrscheinlicher aber ist, daß durch die hydrolytische Wirkung neue, serozymartige Abbauprodukte entstehen. (Auf verschiedene, hierher gehörige Beobachtungen soll bei anderer Gelegenheit eingegangen werden.)

Es wäre auch denkbar, daß die Cytozyme der Gruppe 3 dadurch wirken, daß sie das jeweils entstehende $CaCl_2$-Serozym adsorbieren und auf ihrer Oberfläche konzentrieren. Ein an Kaolin oder Kohle adsorbiertes Thrombin oder Serozym wird hierdurch inaktiv, d. h. eine solche Kaolinsuspension wirkt nicht fällend auf Fibrinogen. Bei den viel kleineren Kolloidteilchen der Lipoidemulsion wäre aber eine Adsorption in noch wirksamer Form wohl möglich. Diese Frage muß vorläufig offen bleiben.

Es bleibt ferner die Möglichkeit zu erwägen, ob gewisse Cytozyme (speziell die Abbauprodukte, [Gruppe 2] die ihrem Bau nach vom Serozym nicht wesentlich verschieden sein dürften), nicht ihrerseits bei der gegenseitigen Einwirkung mit dem Serozym so verändert werden, daß sie als $CaCl_2$-Salzverbindungen Fibrinogen fällende Eigenschaft erlangen.

Aus diesen Erwägungen geht hervor, daß es verfrüht wäre, allen Cytozymen eine ganz identische Wirkung in bezug auf das Serozym und die Thrombinbildung zuzuschreiben. Es wird sich vielmehr für das weitere Studium der Cytozymwirkung empfehlen, gerade den Unterschieden zwischen den einzelnen Cytozymarten nachzugehen. Doch möchten wir vorläufig an der oben geäußerten Ansicht festhalten, daß das Wesentliche aller dieser Körper in einer Steigerung der Serozymbildung zu suchen ist. Da wir das $CaCl_2$-Serozym an sich als das bei der Gerinnung wirksame Agens ansehen, möchten wir das eingangs gegebene Schema des Gerinnungsvorganges folgendermaßen verändern:



wobei die Rolle der Cytozyme als eine auf die Hydrolyse gewisser Serumeiweißkörper (Prothrombin) gerichtete gekennzeichnet ist.

Wir möchten hier zunächst auf den Einwand eingehen, daß es nicht erwiesen sei, daß eine Thrombinbildung wirklich ganz ohne Cytozym stattfinden könne. Denn die als „Serozym" verwendeten Seren können, auch wenn sie aus sorgfältig und zellfrei gewonnenem Plasma stammen, doch geringe Mengen Cytozyms enthalten. Wir haben ja selbst auch aus derartigen Seren durch die Alkoholfällungsmethode gute „Cytozyme" extrahieren können. Nun ist aber nach dieser Extraktion, die gerade die cytozymartigen Stoffe entfernt, eine deutliche Gerinnungsaktivität an dem Alkoholniederschlag nachweisbar, und die daraus hergestellten Lösungen bringen Fibrinogen ohne

Cytozym, bloß auf Zusatz von Kalk, zu rascher Gerinnung. Einen weiteren Beweis für die von uns aufgestellte Behauptung sehen wir ferner in dem im ersten Teil berichteten Verhalten von Fibrinogenlösungen; diese gerinnen (Fraktion I) auch ohne Cytozym durch bloßen Kalkzusatz. Daß hier nicht neben „Serozym" noch „Cytozyme" adsorbiert und an der Reaktion beteiligt sind, geht aus dem Verhalten des alkoholischen Extraktes solcher Fibrinogenlösungen hervor (s. Prot. 4), die auf die Gerinnung nicht fördernd, sondern hemmend wirken, somit kein Cytozym mehr nachweisbar enthalten. Sowie man sich übrigens auf den Boden der von uns aufgestellten Theorie der Fibrinfällung stellt, fällt die Frage nach der Notwendigkeit des Cytozyms von selbst dahin.

Es sei hier noch auf die Tatsache eingegangen, daß das unter Mitwirkung von Cytozymen entstandene Thrombin sich in einigen Punkten von dem bloßen $CaCl_2$-Serozym unterscheidet. Wir möchten in dieser Hinsicht speziell das Verhalten gegenüber Oxalat sowie gegen Kobragift erwähnen. Wie das folgende Protokoll zeigt, wird ein mit Cytozym gebildetes Thrombin durch nachträglichen Zusatz von oxalsaurem Natrium in seiner Wirkung auf Fibrinogen nahezu nicht beeinflußt, während die Gerinnung, die eine bloße $CaCl_2$-Serozymlösung hervorruft, durch Oxalat nicht unwesentlich verzögert wird. Ferner sei die schon früher von uns mitgeteilte Tatsache erwähnt, daß Kobragift das Cytozymthrombin in seiner Wirkung geradezu verstärkt, während eine gleiche Giftmenge zu $CaCl_2$-Serozym zugesetzt, hemmend wirkt.

Protokoll 18. a) Hammelserum, frisch aus Oxalatplasma, wird unter $CaCl_2$-Zusatz mit phys. NaCl-Lösung verdünnt und mit und ohne Cytozym stehen gelassen. Nach 10 Min., 2 und 6 Stunden wird aus jedem der beiden Röhrchen jeweils 0,3 entnommen und auf Thrombingehalt geprüft: in Reihe a) mit Fibrinogen allein, in Reihe b) unter Zusatz von Na-Oxalat (0,1 Na-Oxalat 1 % und hierauf sofort 1 % Fibrinogen). In b) wurde somit der noch fällbare Kalk niedergeschlagen. Es gerinnt:

Serozymlösung	ohne Cytozym a) ohne Oxalat	ohne Cytozym b) mit Oxalat	mit Cytozym a)	mit Cytozym b)
10′ gestanden	6′	14′ netzig	50″	60″
2 Std. "	13′	30′ "	2½′	3′
6 " "	12′	55′ "	3′	4′

Man erkennt eine durchgehende Verzögerung in der Gerinnung der mit Oxalat versetzten Röhrchen, die jedoch bei Cytozymthrombin nicht nur absolut, sondern auch relativ viel geringer ist, während das $CaCl_2$-Serozym durch die vorhergehende Fällung der Ca-Salze überhaupt unfähig wurde, eine vollständige und feste Gerinnung hervorzurufen.

Wird das Oxalat nicht vor, sondern gleichzeitig mit oder nach dem Fibrinogen zugesetzt, so ist die Schädigung der $CaCl_2$-Serozymwirkung eine geringere, wie folgender Versuch zeigt.

b) Ein mit NaCl 10fach verdünntes, mit $CaCl_2$ versetztes Oxalatserum wird, nachdem es 20 Min. gestanden hat, in Dosen von 0,8 und 0,4 mit 1,0 Fibrinogen versetzt; diese Mischung gerinnt nach 9 resp. 22 Min. Wird unmittelbar vor dem Fibrinogen 0,1 Na-Oxalat zugegeben, so wird die Gerinnung nur noch netzig und tritt bei beiden Thrombindosen erst nach 45 Min. ein. Erfolgt der Zusatz des Oxalates unmittelbar nach dem Fibrinogen, so gerinnt die Dose mit 0,8 Thrombin schon nach 23 Min. und zwar in toto; wenn nach Zusatz des Fibrinogens noch 3 Min. gewartet und erst dann das Oxalat zugegeben wird, so tritt typische Gerinnung schon nach 10 resp. 30 Min., also kaum noch später als ohne Oxalatzusatz ein.

Protokoll 19. 15 Min. alte Thrombinlösung, wie üblich frisch bereitet, wird in der Menge von 1,0 mit und ohne 0,1 Kobragiftlösung (1 °/₀₀) gegenüber Fibrinogen geprüft. Mit Kobragift tritt Gerinnung in 4, ohne in $5^1/_2$ Min. ein. — Hammelserum 6fach verdünnt und mit $CaCl_2$ versetzt, steht 45 Min., hierauf wird es mit und ohne 0,1 Kobralösung auf Gerinnungsaktivität geprüft: Gerinnung mit Kobra: 60, ohne: 20 Min. Noch größer sind die Unterschiede, wenn Kobragift von Anfang an zugesetzt wird: je 0,1 Serum + 1,0 NaCl + 0,2 $CaCl_2$ + 0,1 Kobragift steht 45 Min., dann Fibrinogen: Gerinnung in 100 Min. $\pm$, die gleiche Mischung ohne Cobragift 28 Min.

Als Ursache dieses Verhaltens darf angenommen werden, daß $CaCl_2$ durch Na-Oxalat nur so lange ausgefällt und dadurch für die Gerinnungsvorgänge inaktiv wird, als es noch nicht an die Serozym-Abbauprodukte in Salzverbindung getreten ist. Ist dies geschehen, so kann Oxalat nicht mehr schaden. Bei der Gerinnung ohne Cytozym ist nur wenig $CaCl_2$-Serozym vorhanden; setzt man gleichzeitig mit dem Fibrinogen Oxalat zu, so wird hierdurch jede weitere Neubildung verunmöglicht.

Ähnlich wie gegenüber Oxalat scheint sich das $CaCl_2$-Serozym auch dem hydrolytisch wirkenden Kobragift gegenüber zu verhalten. An sich wirkt Kobragift ähnlich wie die kalkhaltigen Peptone (Kobra erwies sich als peptonartiger Körper) auf die Gerinnung beschleunigend; dort, wo aber Thrombin erst gebildet werden muß, wird die Gerinnung durch zu starke Hydro-

lysen verzögert. Dies erklärt den Befund von Massol[1]), daß kleine Dosen Kobragift hemmend, größere beschleunigend wirken; zu dessen Erklärung er die Existenz zweier verschieden wirkender Fermente annahm.

Für die von uns angenommene Wirkung der Cytozyme durch Steigerung der Hydrolyse spricht auch das schnelle Abflauen der Aktivität einer mit Cytozym hergestellten Thrombinlösung. Im folgenden Protokoll ist neben den quantitativen Verhältnissen, die zwischen Cytozymmenge und Thrombinwirkung desselben Serums bestehen, auch die ungleiche Haltbarkeit der rasch entstandenen und maximal wirksamen Thrombinlösungen erkennbar; ähnliches geht aus Protokoll 21 hervor, in dem die Aktivität eines mit und ohne Cytozym gestandenen Serozymserums durch längere Zeit verglichen wurde.

Protokoll 20. Je 1 ccm Hammeloxalatserum wird mit 6, 7,5, 7,8, 7,9 ccm phys. NaCl-Lösung versetzt und dann eine Leberlipoidemulsion in der Menge von 2,0, 0,5, 0,2 und 0,1 ccm zugesetzt; in jedes Röhrchen kommt möglichst gleichzeitig je 0,3 ccm $CaCl_2$-Lösung, worauf in den in der ersten Kolonne angegebenen Zwischenräumen je 0,8 ccm entnommen und in bereitgestellten Röhrchen, die je 1,0 ccm Oxalatplasma (verdünnt) enthalten, auf Thrombinwirkung geprüft wird. Durch Verwendung von Oxalatplasma wird die weitere Thrombinbildung vom Moment der Vermischung an unterbrochen, somit das zur betreffenden Zeit vorhandene Thrombin bestimmt.

Zeit	2,0	0,5	0,2	0,1
3′	17′	fl.	fl.	fl.
7′	2½′	7′	fl.	fl.
10′	2′	4′	15′	fl.
13′	2′	3½′	5½′	22′
18′	2½′	2′	3½′	7′
30′	3½′	3½′	3′	4′
45′	8′	8′	4′	4′
60′	55′	55′	9′	7′
90′	fl.	fl.	fl.	fl.

Es zeigt sich, daß bei Anwendung einer sehr großen Cytozymdose (2,0) schon nach 3 Min. eine gewisse Menge Thrombin nachweisbar war, während eine annähernd gleiche Wirkung durch eine 20 mal kleinere Cytozymdose erst nach 13 Min. erzielt wurde. Umgekehrt beginnt die erste Mischung schon nach 20 Min. sich abzuschwächen, was bei der letzten erst nach 60 Min. der Fall ist; auch bleibt das Maximum der absoluten Wirkung bei Verwendung von wenig Cytozym hinter der mit größeren Cytozymmengen erreichten zurück.

[1]) Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. **158**, S. 1030.

Protokoll 21. Je 0,1 ccm serozymhaltiges (Hammel-)Serum stehen in zwei Serien von Röhrchen a) mit 1,0 NaCl + 0,1 $CaCl_2$, b) 1,0 NaCl + 0,1 $CaCl_2$ + 2 Tropfen Leberlipoidemulsion. Nach den angegebenen Zeiten wird je 1,0 derselben, täglich frisch durch Verdünnung einer 2 %igen Stammlösung hergestellten Fibrinogenlösung zugesetzt. Die Mischungen werden steril gemacht und bis zur Fibrinogenzugabe im Kühlraum (5°) aufbewahrt. Es gerinnt

	Zeit bis zur Fibrinogenzugabe							
	sofort	18′	35′	60′	120′	26 St.	50 St.	74 St.
Reihe a ($CaCl_2$ allein)	12′	10′	11′	10′	12½′	9′	10′	7′
„ b (mit Cytozym)	4½′	50″	1½′	3′	3′	20′	25′	20′

Das Wesentliche für das Zustandekommen der Gerinnung ist somit das Auftreten bestimmter Eiweißabbauprodukte in der Form von $CaCl_2$-Verbindungen, die von dem kolloidal verteilten Fibrinogen adsorbiert werden und dasselbe dadurch zum Ausfallen bringen. Durch die vorhergehenden Versuche wurde es wahrscheinlich, daß die hierbei beteiligten Abbauprodukte (das „Serozym“) polypeptidartige Körper sind, und daß die Cytozyme im wesentlichen durch eine Steigerung der hydrolytischen (serozymbildenden) Vorgänge des Plasmas oder Serums wirken.

Fragen wir uns nun, wieso das zirkulierende Blut flüssig bleibt, nach der Entnahme aus den Blutgefäßen dagegen gerinnt, so muß zunächst darauf hingewiesen werden, daß das Blut eine Fibrinogenlösung ist, in welcher sich neben anderen Salzen hauptsächlich NaCl (etwa 0,8 %), dagegen weit weniger $CaCl_2$ (0,02 bis 0,1 % CaO) vorfindet. Die meisten Abbauprodukte werden daher als NaCl-Salzverbindungen vorkommen, somit in einer Form, in welcher sie die Lösung des Fibrinogens bewirken resp. aufrecht erhalten. Erst wenn solche Abbauprodukte in größerer Menge auftreten, welche sehr leicht (selbst bei Anwesenheit von NaCl) Salzverbindungen mit $CaCl_2$ eingehen, wenn also Thrombin entsteht, ist die Möglichkeit einer Gerinnung gegeben. Eine derartige Thrombinbildung findet normalerweise im strömenden Blute nicht in genügender Menge statt. Zwar ist anzunehmen, daß serozymartige Abbauprodukte

als Zwischenprodukte des Eiweißstoffwechsels in kleinen Mengen stets vorhanden sind, ebenso wie cytozymartige Körper (Eiweißabbauprodukte, Lipoide) schon im zirkulierenden Blute vorkommen dürften. Gegenüber den fibrinogenlösenden Momenten, den stets reichlich durch Nahrung- und Zellstoffwechsel herbeiströmenden NaCl-Abbauprodukten sind sie jedoch in verschwindender Minderheit.

Wird das Blut aus dem Kreislauf ausgeschaltet, so hängt Eintritt und Verlauf der Gerinnung von der Stärke jener Momente ab, welche die Serozymbildung anregen resp. eindämmen. Bleibt das Blut in den unverletzten Gefäßen, so wird das vorhandene Übergewicht der lösenden Faktoren nur langsam zurückgehen, und es dauert Stunden, bis Gerinnungen zustande kommen. Anders wenn durch Entnahme einer Blutprobe in zweifacher Hinsicht eine wesentliche Änderung erfolgt; einerseits durch Schädigung der Blutzellen (spez. Blutplättchen) und Beimengung von Gewebssaft (Wundsekret) Cytozymsubstanzen frei werden, andererseits durch Adsorptionsvorgänge an die Gefäßwandungen die Möglichkeit zu hydrolytischen Spaltungen erhöht wird. Alle Einzelheiten der Entnahme und Aufbewahrung, die den Zellzerfall und die Adsorption, ja ganz allgemein die Serumhydrolyse steigern, beschleunigen die Gerinnung. So die Glaswand des Gefäßes (Alkaliabgabe und dadurch vermehrter Plättchenzerfall nach Deetjen[1]), Adsorption von Abbauprodukten und dadurch Störung des bestehenden Gleichgewichtes zugunsten von Hydrolysen), der Kontakt mit der Luft (Abdunsten von CO_2 und Zunahme der für Hydrolyse günstigen OH-Konzentration [nach Deetjen]), Freiwerden größerer Cytozymmengen aus den Blutzellen oder aus Wundsekret usw. Wogegen Paraffinieren der Gefäße und Kanülen, Auffangen bei Luftabschluß (unter Paraffinum liquid.) rasche Herabsetzung der Autolyse durch Abkühlen des Blutes usw. der Gerinnung entgegenwirken; bei Tieren mit weniger leicht gerinnendem Blut (Pferd, Kaninchen) reichen derartige Maßnahmen aus, um eine Blutprobe lange Zeit, eventuell dauernd flüssig zu erhalten.

Die hier entwickelte Auffassung des Gerinnungsvorganges

---

[1]) Deetjen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 63, 1, 1909.

dürfte aus der Berücksichtigung der die Gerinnung beeinflussenden Eingriffe oder Zusätze noch weitere Stützen erfahren. Fangen wir Blut in stärker konzentrierter NaCl-Lösung auf, so daß eine schließliche Konzentration von 2 bis 3 $^0/_0$ resultiert, so setzen wir dadurch die Möglichkeit einer hydrolytischen Spaltung wesentlich herab; auch wird die Entstehung von $CaCl_2$-Verbindungen gegenüber solchen mit NaCl sehr zurückgedrängt. Es entsteht daher kein Thrombin, selbst wenn Cytozym zugegen ist. Erst wenn durch Verdünnung mit Wasser die Bedingungen zur Hydrolyse gegeben sind, tritt die Gerinnung ein. (Da auch fertiges Thrombin im Salzmedium keine Gerinnung hervorruft, folgt, daß auch die Fällbarkeit des Fibrinogens mit steigender Salzkonzentration herabgesetzt wird.)

Anders als ein Überschuß von Salz wirken solche Verbindungen, die den Kalk in eine zu Salzverbindungen ungeeignete Form bringen, sei es, daß sie ihn direkt ausfällen (Oxalate, Fluoride) oder in andere schlecht dissoziierte Salze umwandeln (Citrat). Wesentlich verschieden ist die gerinnungshemmende Wirkung der sogenannten Antithrombine. Soweit wir dieselben bis jetzt untersucht haben, handelt es sich hierbei um Eiweißabbauprodukte, die kräftig abbauend wirken und daher eine rasche, aber zu weitgehende Hydrolyse hervorrufen. Sie könnten in dreifacher Weise die Gerinnung hemmen: sie erhöhen die Menge der Abbauprodukte und somit der das Fibrinogen in Lösung haltenden Faktoren im Plasma einerseits unmittelbar durch ihre bloße Anwesenheit, andererseits durch den von ihnen bedingten Abbau der Serumeiweißkörper; schließlich könnten sie auch das Serozym beeinflussen und durch zu starke Aufspaltung unwirksam machen. Die letzte Möglichkeit dürfte nur bei manchen dieser Substanzen in Betracht kommen, während dort, wo die Antithrombinwirkung durch größere Cytozymdosen überwunden werden kann, eher die anderen Erklärungen zutreffen dürften. Die Herabsetzung der Gerinnbarkeit des Blutes nach Peptoninjektion (Hund), beim anaphylaktischen Chok usw. beruht sehr wahrscheinlich gleichfalls auf Abbauvorgängen, wobei die Leber modifizierend eingreift; sie sollen Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Das durch Gerinnung ausgefallene Fibrin kann nur sehr unvollständig und langsam (in Salzlösungen) wieder in

Lösung gebracht werden, weil es ja gerade solche Abbauprodukte adsorbiert hat, die Fibrinogen ausfällen (Thrombin). Leichter lassen sich durch allmähliche Autolyse aus gewaschenem Fibrin geringe Mengen der $CaCl_2$-Abbauprodukte ablösen (Thrombinlösung nach Nolf). Erst wenn stärkere Autolysen einsetzen und das Thrombin selbst abbauen, kommt es zur Auflösung des Koagulums (Fibrinolyse)[1]), womit der Endpunkt der mit der Gerinnung zusammenhängenden Erscheinungen erreicht ist.

Zusammenfassung.

1. Um Fibrinogen in kolloidale Lösung zu bringen, ist die Anwesenheit von gewissen Eiweißabbauprodukten erforderlich. Diese vermitteln die Lösung nicht als solche, sondern in Form von NaCl-Salzverbindungen (Pfeiffer). Werden sie dagegen in $CaCl_2$-Verbindungen umgewandelt, so wirken sie nicht mehr lösend, sie werden vielmehr von den Eiweißteilchen adsorbiert und führen, sobald genügende Mengen vorhanden sind, zur Fällung derselben (Gerinnung). Manche Abbauprodukte haben eine besonders ausgesprochene Neigung, $CaCl_2$-Verbindungen einzugehen und als solche die Fällung des Fibrinogens zu bewirken; wir bezeichnen sie als „Serozym" resp. als „Thrombin", wenn sie bereits mit $CaCl_2$ verbunden sind. Das „Thrombin" besteht somit aus $CaCl_2$-Verbindungen gewisser polypeptidartiger Abbauprodukte.

2. Die serozymartig wirkenden Eiweißabbauprodukte entstehen im Plasma oder Serum durch hydrolytische Spaltungen aus deren Eiweißkörpern. Daher steigern alle Eingriffe oder Zusätze, welche Hydrolysen begünstigen (Verdünnung mit H_2O oder NaCl, $^n/_{800}$-HCl, glykocholsaures Natrium, gewisse Eiweißabbauprodukte), den Serozymcharakter eines Serums. Zu weit gehende Hydrolysen wirken schädigend, daher wird angenommen, daß Serozym ein polypeptidartiger Körper ist. Auch in

---

[1]) Nolf hat die Gerinnung als die erste Stufe der Autolyse bezeichnet. Obwohl auch wir die Thrombinbildung auf eine Art von Serumhydrolyse zurückführen, möchten wir doch die zur Fibrinogenfällung führenden von den das Fibrin wieder auflösenden Faktoren prinzipiell trennen.

Eiereiweiß und Speichel konnten serozymartige Körper nachgewiesen werden.

3. Die Cytozyme sind Stoffe, die in serozymhaltigen Seren eine Steigerung ihrer Thrombinwirkung hervorrufen, und zwar durch Erhöhung der Hydrolyse. Sie erreichen dies teils durch ihre chemische Natur, teils durch Oberflächenwirkungen (Adsorption: thromboplastische Substanzen). Manche Körper vereinigen beide Wirkungsarten (Lipoidemulsionen).

Der Blutzuckergehalt des Menschen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.

I. Mitteilung.

a) Blutzuckergehalt nach gemischter Nahrungsaufnahme.
b) Blutzucker und vasculäre Hypertonie.

Von

Ernst Hirsch.

(Aus dem Laboratorium des Handelsspitales in Prag.
[Direktor: Prof. Dr. E. Münzer].)

(Eingegangen am 29. März 1916.)

Der Harn ist kein getreues Spiegelbild der Blutflüssigkeit; die Niere besitzt das Vermögen, elektiv einerseits Stoffe dem Blute zu entziehen und auszuscheiden, andererseits solche ganz zurückzuweisen.

Mit der Erkenntnis dieser Tatsachen erschien es als dringendes Postulat klinischer Diagnostik, neben genauen Harnuntersuchungen eine genauere Prüfung der Blutflüssigkeit durchzuführen, als dies bisher üblich gewesen war.

So erklärt sich auch die in den letzten Jahren mit großem Erfolg durchgeführte Ausbildung der diesbezüglichen Methodik; ich verweise nur auf die Bestimmung des Blutzuckers, des Reststickstoffes, des Kochsalzes, der Harnsäure, der Wasserstoffionenkonzentration usw.

Besonders die Bestimmung des Blutzuckergehaltes neben jener des Harnzuckers hat unsere Kenntnisse des intermediären Kohlenhydratstoffwechsels wesentlich gefördert und uns einen tieferen Einblick in die Verhältnisse der Glucosurien gewährt.

Einen kleinen Beitrag zur Lehre von dem Verhalten des Blutzuckers im menschlichen Organismus unter physiologischen und pathologischen Bedingungen sollen nachfolgende Untersuchungen darstellen.

Vor allem wollten wir uns ein Bild über die täglichen Blutzuckerschwankungen beim normal ernährten und gesunden Individuum machen. Die Blutuntersuchungen wurden öfters am Tage wiederholt, hauptsächlich mit Rücksicht darauf, den Einfluß einer gewöhnlichen Krankenhausnormalkost auf den Blutzuckergehalt festzustellen.

Bemerkt sei, daß die Personen während des Untersuchungstages sich ruhig verhielten, keinerlei körperliche Arbeit leisteten.

Zu den Blutzuckerbestimmungen bedienten wir uns der Bangschen Mikromethode; das Blut wurde der Fingerbeere entnommen; es wurden stets 3 Kontrollanalysen ausgeführt.

1. J. W., 35 a., gesunder kräftiger Mann.

9^{30}	nach d. I. Frühst. 0,08 $^0/_0$ Blz.	7^{00}	250 g Kaffee, 1 Brötchen
2^{00}	nach d. Mittagessen 0,12 $^0/_0$ Blz.	12^{00}	250 g Suppe, 100 g Rindfleisch, 300 g Gemüse
5^{00}	p. m. nach d. Kaffee 0,09 $^0/_0$ Blz.	4^{00}	250 g Kaffee, 2 Brötchen.

2. W. A., 22 a., Rekonvaleszent nach Polyanthr. rheum.

9^{30}	nach d. I. Frühst. 0,09 $^0/_0$ Blz.	8^{00}	250 g Kaffee, 2 Brötchen
12^{30}	nach d. Mittagessen 0,08 $^0/_0$ Blz.	12^{00}	250 g klare Suppe, 100 g Rindfleisch, 300 g Kartoffeln
5^{00}	nach dem Kaffee 0,09 $^0/_0$ Blz.	4^{00}	250 g Milchkaffee, 2 Brötchen.

3. M. J., 34 a., leichte Neurasthenie.

9^{00}	nach d. I. Frühst. 0,11 $^0/_0$ Blz.	8^{00}	300 g Milchkaffee, 1 Brötchen
12^{10}	nach d. Mittagessen 0,10 $^0/_0$ Blz.	12^{00}	300 g Grießsuppe, 100 g Rindfleisch, 300 g Kartoffelbrei
5^{00}	nach dem Kaffee 0,10 $^0/_0$ Blz.	5^{00}	300 g Milchkaffee, 2 Brötchen.

4. B. Fr., 36 a., gesund.

9^{00}	nach d. I. Frühst. 0,11 $^0/_0$ Blz.	7^{00}	250 g Milchkaffee, 1 Brötchen
12^{30}	vor dem Mittagessen 0,09 $^0/_0$ Blz.	12^{00}	250 g Suppe, 100 g Schweinefleisch, 300 g Reis
5^{00}	nach dem Kaffee 0,11 $^0/_0$ Blz.	4^{00}	250 g Milchkaffee, 2 Brötchen.

5. H. J., 30 a., gesund.

7^{40}	nach d. I. Frühst. 0,12 $^0/_0$ Blz.	7^{00}	300 g Milchkaffee, 1 Brötchen
12^{20}	vor dem Mittagessen 0,09 $^0/_0$ Blz.	12^{30}	250 g Reissuppe, 100 g Rindfleisch, 300 g Gemüse
4^{30}	nach dem Kaffee 0,14 $^0/_0$ Blz.	4^{00}	250 g Milchkaffee, 2 Brötchen.

6. Kr. L., 42 a., gesund.

8^{00}	nach d. I. Frühst. 0,11 $^0/_0$ Blz.	7^{00}	300 g Milchkaffee, 2 Brötchen
12^{00}	vor dem Mittagessen 0,11 $^0/_0$ Blz.	12^{30}	250 g Rindsuppe, 100 g Rindfleisch, 250 g Gemüse
4^{30}	n. Mittagessen u. Kaffee 0,16 $^0/_0$ Blz.	4^{00}	250 g Kaffee, 2 Brötchen.

7. K. L., 34 a., gesund.

8^{00}	nach d. I. Frühst. 0,12 $^0/_0$ Blz.	7^{00}	250 g Milchkaffee, 1 Brötchen
12^{00}	vor dem Mittagessen 0,11 $^0/_0$ Blz.	12^{30}	300 g Suppe, 100 g Kalbfleisch, 300 g Kartoffelbrei
4^{30}	nach dem Kaffee 0,11 $^0/_0$ Blz.	4^{00}	250 g Milchkaffee, 2 Brötchen.

8. K. L., 34 a. (derselbe wie 7).

Zeit	Blutzucker	Zeit	Nahrung
8^{00}	nüchtern 0,12 % Blz.	8^{30}	300 g Milchkaffee, 1 Brötchen
10^{15}	nach d. I. Frühst. 0,14 % Blz.		
12^{00}	vor dem Mittagessen 0,12 % Blz.	12^{30}	300 g Fleischsuppe, 100 g Rindfl., 300 g Pellkartoffeln, 1 Brötchen
2^{15}	nach d. Mittagessen 0,13 % Blz.		
4^{15}	vor dem Kaffee 0,12 % Blz.	4^{30}	300 g Milchkaffee, 1 Brötchen
6^{00}	nach dem Kaffee 0,12 % Blz.		
8^{00}	vor dem Abendessen 0,10 % Blz.		

9. K. Fr., 25 a., Neurastheniker.

Zeit	Blutzucker	Zeit	Nahrung
8^{00}	nüchtern 0,11 % Blz.	8^{30}	300 g Milchkaffee, 2 Brötchen
10^{00}	nach d. I. Frühst. 0,10 % Blz.		
12^{00}	vor dem Mittagessen 0,11 % Blz.	12^{30}	300 g Grießsuppe, 100 g Kalbfleisch, 250 g Gemüse, 1 Brötchen
2^{15}	nach d. Mittagessen 0,10 % Blz.		
4^{00}	vor dem Kaffee 0,16 % Blz.		
6^{15}	nach dem Kaffee 0,11 % Blz.	4^{30}	300 g Milchkaffee, 2 Brötchen
8^{00}	vor dem Abendessen 0,09 % Blz.		

10. Gr. Fr., 26 a., gesund.

Zeit	Blutzucker	Zeit	Nahrung
9^{00}	nüchtern 0,10 % Blz.	9^{30}	300 g Kaffee, 2 Brötchen
11^{10}	nach dem Frühstück 0,09 % Blz.	12^{30}	300 g Suppe, 230 g Kartoffeln, 100 g Fleisch
1^{00}	nach d. Mittagessen 0,10 % Blz.		
3^{00}	nach dem Kaffee 0,17 % Blz.	2^{50}	600 g Kaffee, 140 g Weißbrot
5^{00}	nach dem Kaffee 0,09 % Blz.	6^{30}	80 g Hering, 300 g Kartoffeln, 300 g Kaffee
7^{00}	nach dem Abendbrot 0,11 % Blz.		

11. U. K., 28 a., gesund.

Zeit	Blutzucker	Zeit	Nahrung
9^{00}	nüchtern 0,11 % Blz.	9^{30}	300 g Kaffee, 2 Brötchen
11^{00}	nach dem Frühstück 0,12 % Blz.	12^{30}	300 g Suppe, 230 g Makkaroni, 100 g Fleisch
1^{00}	nach d. Mittagessen 0,13 % Blz.		
3^{00}	nach dem Kaffee 0,14 % Blz.	2^{30}	600 g Kaffee, 140 g Weißbrot
5^{00}	nach dem Kaffee 0,12 % Blz.	6^{30}	100 g Bratkartoffeln, 90 g Wurst, 60 g Brot, 200 g Kaffee
7^{00}	nach dem Abendbrot 0,12 % Blz.		

12. J. M., 24 a., gesund.

Zeit	Blutzucker	Zeit	Nahrung
9^{00}	nüchtern 0,11 % Blz.	9^{30}	300 g Milchkaffee, 2 Brötchen
11^{00}	nach dem Frühstück 0,13 % Blz.	12^{00}	300 g Rindsuppe, 75 g Fleisch, 200 g Kartoffeln, 150 g Gemüse
1^{00}	nach d. Mittagessen 0,12 % Blz.		
3^{00}	nach dem Kaffee 0,10 % Blz.	2^{30}	300 g Milchtee, 125 g Brot
5^{00}	nach dem Kaffee 0,12 % Blz.	6^{30}	50 g Brot, 200 g Gulasch, 300 g Nudeln
7^{00}	nach dem Abendbrot 0,13 % Blz.		

13. R. A., 26 a., Neurastheniker.

Zeit	Blutzucker	Zeit	Nahrung
9^{10}	nüchtern 0,11 $^0/_0$ Blz.	9^{30}	300 g Milchkaffee, 2 Brötchen
12^{15}	nach dem Frühstück 0,14 $^0/_0$ Blz.	12^{30}	300 g Fleischsuppe, 100 g Rindfleisch, 230 g Kartoffelbrei
2^{30}	nach d. Mittagessen 0,09 $^0/_0$ Blz.		
5^{00}	nach dem Kaffee 0,16 $^0/_0$ Blz.	3^{30}	300 g Milchkaffee, 2 Brötchen
7^{00}	nach dem Abendbrot 0,17 $^0/_0$ Blz.	6^{30}	100 g Kartoffeln, 100 g Fleisch, 50 g Brötchen.

14. Sch. A., 24 a., gesund.

Zeit	Blutzucker	Zeit	Nahrung
10^{00}	nach d. I. Frühst. 0,10 $^0/_0$ Blz.	8^{00}	300 g Milchkaffee, 1 Brötchen
12^{00}	nach d. II. Frühst. 0,10 $^0/_0$ Blz.	10^{00}	50 g Wurst, 1 Brötchen
2^{00}	nach d. Mittagessen 0,11 $^0/_0$ Blz.	12^{00}	200 g Fleischsuppe, 100 g Rindfleisch, 200 g Mehlspeise
4^{00}	nach dem Kaffee 0,11 $^0/_0$ Blz.	3^{00}	300 g Milchkaffee, 1 Brötchen
6^{00}	nach dem Kaffee 0,12 $^0/_0$ Blz.	6^{30}	100 g Fleisch, 200 g Kartoffeln, 1 Brötchen.
9^{00}	nach dem Abendbrot 0,10 $^0/_0$ Blz.		

15. K. Fr., 28 a., gesund.

Zeit	Blutzucker	Zeit	Nahrung
9^{00}	nüchtern 0,11 $^0/_0$ Blz.	10^{00}	300 g Kaffee, 1 Brötchen
3^{00}	nach d. Mittagessen 0,12 $^0/_0$ Blz.	12^{00}	300 g Rindsuppe, 200 g Kalbfleisch, 200 g Nudeln
4^{00}	nach dem Kaffee 0,15 $^0/_0$ Blz.	3^{30}	300 g Milchkaffee, 1 Brötchen
6^{30}	nach dem Kaffee 0,10 $^0/_0$ Blz.	7^{00}	200 g Rindfleisch, 300 g Kartoffeln, 1 Brötchen.
8^{00}	vor dem Abendbrot 0,12 $^0/_0$ Blz.		
9^{00}	nach dem Abendbrot 0,10 $^0/_0$ Blz.		

Bei den vier folgenden Personen wurde der Einfluß von 100 g Rohrzucker (in Tee genommen) auf den Blutzuckergehalt untersucht. Wir wollten uns hierbei ein Bild schaffen von der Einwirkung des Rohrzuckers auf den Blutzuckerspiegel gesunder Personen, als Vorversuche für die folgenden Angaben.

16. Sch. E., 26 a., gesund.

11^{00} nüchtern 0,11 $^0/_0$ Blz.
12^{00} 1 Stunde nach Genuß von 100 g Rohrzucker 0,12 $^0/_0$ Blz.
1^{00} 2 Stunden nach Genuß von 100 g Rohrzucker 0,09 $^0/_0$ Blz.

17. H. F., 28 a., gesund.

11^{00} nüchtern 0,10 $^0/_0$ Blz.
12^{00} 1 Stunde nach 100 g Rohrzucker 0,12 $^0/_0$ Blz.
1^{00} 2 Stunden nach 100 g Rohrzucker 0,10 $^0/_0$ Blz.

18. J. J., 47 a., gesund.

11^{00} nüchtern 0,10 $^0/_0$ Blz.
12^{00} 1 Stunde nach 100 g Rohrzucker 0,13 $^0/_0$ Blz.
1^{00} 2 Stunden nach 100 g Rohrzucker 0,10 $^0/_0$ Blz.

19. D. O., 16 a.

11^{00} nüchtern 0,10 % Blz.

12^{00} 1 Stunde nach 100 g Rohrzucker 0,17 % Blz.

1^{00} 2 Stunden nach 100 g Rohrzucker 0,10 % Blz.

Auf Grund der vorliegenden Untersuchungen können wir sagen, daß die normale tägliche Nahrungsaufnahme von entschiedenem Einfluß auf die Höhe des Blutzuckergehaltes ist. Natürlich kommt dieser Einfluß erst bei wiederholten Untersuchungen und da am deutlichsten zum Ausdruck. Der Nüchternwert ist immer der geringste und hält sich natürlicherweise bei Gesunden in normalen Grenzen, jedoch auch die Werte nach der ersten Nahrungsaufnahme (I. Frühstück) übersteigen nicht 0,12 %.

Die höchsten Werte 0,17 % Blz. wurden nach der Hauptmahlzeit, dem Mittagessen, erreicht und fallen ungefähr in die Zeit zwischen 3 Uhr bis 5 Uhr p. m. Von da an fallen die Werte wieder auf ein annähernd normales Niveau, das Abendbrot vermag eine neuerliche Steigerung nicht mehr hervorzurufen. (Wir haben hier immer eine Krankenhausnormalkost im Auge, was übrigens auch aus den angeführten Tabellen hervorgeht.)

Die hohen Werte in den Nachmittagsstunden sind wohl auf die größere Menge der aufgenommenen Nahrung einerseits, auf den dadurch bedingten lebhafteren Stoffaustausch und Stoffwechsel andererseits zurückzuführen. Hierbei ist bemerkenswert das Bestreben des gesunden Organismus, die Blutzuckerkonzentration in kürzester Zeit wieder auf das Normalniveau einzustellen.

Vergleichen wir unsere Ergebnisse mit denen anderer Autoren, so muß darauf hingewiesen werden, daß unseres Wissens systematische Blutzuckeruntersuchungen nach gemischter Nahrungsaufnahme nicht angestellt wurden.

Die Ergebnisse von Bang, Bing und Jacobsen, Boudouin, Frank, Reicher und Stein, Tachau, Wels u. a. beziehen sich fast ausschließlich auf Blutzuckeruntersuchungen nach Zuführung größerer oder kleinerer Kohlenhydratmengen.

Bei den von uns angeführten vier gesunden Personen war nach Zufuhr von 100 g Rohrzucker immer eine geringe Zunahme des Blutzuckergehaltes eingetreten, nur einmal erreichte sie den

relativ hohen Wert von 0,17 %. Nach 2 Stunden waren die Werte in allen Fällen wieder normal. Diese Befunde decken sich fast vollständig mit denen, die die oben angeführten Autoren nach 100 g Glucose erzielten; 0,16 und 0,17 % stellen auch die höchsten Werte dar, die Bing und Jacobsen 1 Stunde nach Darreichung von 100 g Traubenzucker erzielten.

Der Einfluß der Saccharose (Rohrzucker) auf den Blutzuckergehalt des Menschen wurde unseres Wissens nur von Jacobsen[1]) geprüft, der in einem Falle ähnliche Hyperglykämie beobachtete wie nach Traubenzucker.

Wir wählten diesen Zucker, weil er einmal die gewöhnliche in der Nahrung verabreichte Zuckerart darstellt, dann aber auch wegen des billigen Preises. Saccharoseversuche am Tier (Kaninchen) wurden von Bang gemacht, der nachwies, „daß der Anstieg der Blutzuckerkurve hier ebenso schnell einsetzt, wie nach den Monosen".

Blutzucker und vasculäre Hypertonie.

Wir gingen in den folgenden Untersuchungen darauf aus, die Verhältnisse bei vasculärer Hypertonie klären zu wollen.

Durch E. Neubauer[2]) war festgestellt worden, daß bei chronischer Nierenentzündung mit Blutdrucksteigerung Hyperglykämie vorkommt ohne Glucosurie; zur Erklärung dieses Befundes wurde eine erhöhte Dichtigkeit der Nieren gegen Zucker angenommen.

Nun erhebt sich die weitere, auch von E. Neubauer sofort gestellte Frage: „Wie kommt nun die bei Nephritis beobachtete Hyperglykämie zustande?"[3])

Da Nierenschädigung selbst nicht zu Hyperglykämie führt, schließt Neubauer, „daß die bei Hochdrucknephritis vorkommende Hyperglykämie mit einer veränderten Nebennierenfunktion in Beziehung steht[4])".

Bevor wir zur Diskussion dieser Anschauungen übergehen, erscheint es angezeigt, unsere eigenen Beobachtungen mitzuteilen.

---

[1]) Th. B. Jacobsen, Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Nahrungsmittel auf den Blutzucker . . . Diese Zeitschr. 56, 1913.

[2]) E. Neubauer, Über Hyperglykämie bei Hochdrucknephritis und die Beziehungen . . . Diese Zeitschr. 25, 284, 1910.

[3]) l. c. S. 292.

[4]) l. c. Nr. 294.

Es wurden in 19 Fällen von vasculärer Hypertonie Blut und Harn nüchtern und 1 Stunde nach Verabreichung von 100 g Saccharose auf Zucker untersucht.

Die vorliegende Tabelle ergibt das Resultat. Wir sehen, daß in 11 der angeführten Fälle die Anfangswerte (Nüchternwerte) beträchtlich erhöht sind, mindestens aber 0,11 $^0/_0$ übersteigen. Die gefundenen Höchstwerte sind 0,18 und 0,20 $^0/_0$.

Name, Alter, Diagnose	Blutdruck Hp.	Bemerkungen zum Status	Harn v. Zuckergenuß	Blutzuck. v. Zuckergenuß	Harn 1 Std. nach Zuckergenuß	Blutzuck. 1 Std. nach Zuckergenuß
1. Herr Dr. R., 55 a., vasculäre Hypertonie .	200/120	Angedeutet. Puls. alt. Eiweiß in Spuren	—	0,15 $^0/_0$	—	0,16 $^0/_0$
2. Herr L. R., 58 a., v. H. Aortitis	200/140	—	—	0,17 $^0/_0$	—	0,17 $^0/_0$
3. Herr E. Sch., 63 a., v. H	185/120	—	—	0,15 $^0/_0$	—	0,14 $^0/_0$
4. Frau B. E., 46 a., v. H. Neurasthenie . .	230/150	Eiweißspur, Herz u. Aorta nach l. u. r. vergrößert	—	0,14 $^0/_0$	—	0,18 $^0/_0$
5. Herr R. A., 32 a., v. H.	190/120	—	—	0,13 $^0/_0$	—	0,14 $^0/_0$
6. „ H. A., 51 a., Angina pectoris . .	170/90	Kein Eiweiß	—	0,11 $^0/_0$	—	0,15 $^0/_0$
7. Herr E. L., 24 a., v. H.	170	Neurasthenie	—	0,10 $^0/_0$	—	0,16 $^0/_0$
8. „ R. Z., 69 a., Gicht	170/100	Früh. Eiweißspur Zuckerspur	—	0,11 $^0/_0$	—	0,14 $^0/_0$
9. Frau M. A., 66 a., v. H. Gicht	190/100	Kein Eiweiß, kein Zucker	—	0,12 $^0/_0$	—	0,14 $^0/_0$
10. Frau R. H., 51 a., v. H. Gicht	180/90	Kein Eiweiß, kein Zucker	—	0,10 $^0/_0$	—	0,11 $^0/_0$
11. Herr F. L., 57 a., v. H. Aortitis	190/130	nach 2 Std. 0,12 $^0/_0$ Blutzucker	—	0,10 $^0/_0$	—	0,15 $^0/_0$
12. Herr P., 52 a., v. H. .	220/140	Eiweiß im Harn	—	0,10 $^0/_0$	—	0,13 $^0/_0$
13. „ Schw., 53 a., v. H. Myodegen. cordis .	190/95	Kein Eiweiß, kein Zucker	—	0,18 $^0/_0$	—	0,23 $^0/_0$
14. Herr St., 60 a., v. H. .	190/120	Aortensklerose, Eiweiß in Spuren	—	0,12 $^0/_0$	—	0,13 $^0/_0$
15. „ N. M., 62 a., v. H.	205/120	Eiweiß in Spuren	—	0,11 $^0/_0$	0,1 $^0/_0$	0,15 $^0/_0$
16. „ J. St., 51 a., Nephritis chronica .	250/140	Sehr viel Eiweiß, bisweilen Zucker in Spuren	—	0,20 $^0/_0$	0,4 $^0/_0$	0,25 $^0/_0$
17. Herr F. M., 60 a., v. H.	250/160	Eiweiß in Spuren	—	0,11 $^0/_0$	2,0 $^0/_0$	0,20 $^0/_0$
18. „ L., 60 a., v. H. Gicht	180/160	Eiweiß in Spuren	—	0,12 $^0/_0$	0,20 $^0/_0$	0,16 $^0/_0$
19. Herr P., 68 a., v. H. .	190	Kein Eiweiß, nie Zucker	—	0,16 $^0/_0$	0,7 $^0/_0$	0,21 $^0/_0$

Ein Zusammenhang zwischen Höhe des Blutdruckes und Höhe des Blutzuckergehaltes konnte nicht festgestellt werden.

Ausdrücklich sei betont, daß es sich in keinem der Fälle

um einen Diabetes, auch nicht um einen latenten Diabetes handelte.

Nur in 5 Fällen trat 1 Stunde nach Verabreichung von 100 g Saccharose Zucker im Harn auf. Der Prozentgehalt war allerdings ein geringer. Von diesen 5 Fällen haben nur 2 einen hohen Blutzuckernüchternwert, die 3 übrigen einen Normalwert.

In allen Fällen ist jedoch eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels nach Zuckerzufuhr nachzuweisen, die Zunahme steht gewöhnlich im Verhältnis zum Anfangswert. Ist dieser ein höherer, so ist auch die Zunahme des Blutzuckergehaltes eine dementsprechende.

Bemerkenswert ist ferner, daß kein bestimmtes Verhältnis zwischen Blutzuckergehalt und Glucosurie besteht. Fall 13 z. B. mit 0,18% Blutzucker vor der Zuckeraufnahme, 0,23% Blutzucker 1 Std. später, zeigt keine Glucosurie, während andererseits Fälle mit 0,15 und 0,16% Blutzucker nach der Zuckerzufuhr mit Glucosurie reagieren.

Auffallend könnte es erscheinen, daß in den 5 Fällen, in denen Zucker im Harn auftrat, schon bei früheren Untersuchungen Eiweiß konstatiert werden konnte. Diesen 5 Fällen können jedoch 5 andere gegenübergestellt werden, bei denen trotz des Eiweißbefundes Zucker nicht gefunden wurde. Es kann also die Schädigung der Nieren für die Zuckerdurchlässigkeit direkt nicht verantwortlich gemacht werden.

Fassen wir die Ergebnisse unserer Untersuchungen zusammen, so resultiert daraus, 1. daß bei vasculärer Hypertonie sehr oft eine Blutzuckererhöhung vorkommt, die nicht mit Glucosurie verbunden ist, 2. daß 1 Stunde nach Zufuhr von 100 g Saccharose jedoch der Blutzuckergehalt derart steigen kann, daß Zucker im Harn auftritt.

Unsere Untersuchungen bestätigen also zunächst die Angaben von E. Neubauer vom Vorhandensein einer Hyperglykämie bei vasculärer Hypertonie und zeigen, daß es alimentär hier häufig zur Glucosurie kommt.

Jetzt ist es an der Zeit, der von Neubauer aufgeworfenen Frage nach der Ursache der Hyperglykämie bei Hochdrucknephritis näherzutreten. Die nach ihm dieses Gebiet bearbeitenden Autoren — ich nenne Bennigson[1]), Borchard und

[1]) W. Bennigson, Diss. Königsberg. Ref. Kongreß-Centralbl. 9, 469.

Bennigson[1]), Bing und Jacobson[2]), Port[3]), Landau[4]), Rolly und Oppermann[5]) lehnen durchweg den Zusammenhang von Blutdrucksteigerung und Hyperglykämie ab und nehmen entweder, wie Bennigson und Borchard an, daß es dann zur Blutzuckervermehrung komme, wenn die Nierenerkrankung zu einer Störung der Chlorausscheidung führte, oder sie beziehen die Blutzuckersteigerung auf Störungen der Atmung, Dyspnoe und Asphyxie, wie Bing und Jacobson, und Rolly und Oppermann, oder endlich auf nervöse Einflüsse (Apoplexie, Urämie) wie Landau.

Nur ein Autor, Rusca[6]), glaubt Beziehungen zwischen Hypertonie und Hyperglykämie annehmen zu müssen.

In unseren Fällen bestand weder eine Nephritis mit Störung der Kochsalzausscheidung, noch bestanden urämische Erscheinungen, es bestand weder Dyspnoe, noch handelte es sich um Folgezustände apoplektischer Insulte.

Wir waren in der Auswahl der Fälle sehr streng gewesen und hatten vorzüglich Fälle in Beobachtung gezogen, die das Bild der vasculären Hypertonie zeigten ohne nennenswerte Organerkrankung.

Uns selbst scheint, daß E. Neubauer und mit ihm alle nachfolgenden Forscher die Frage selbst kompliziert haben, indem sie zwei voneinander unabhängige Erscheinungen — Blutdruck und Nephritis — in ihren Beziehungen zur Hyperglykämie studieren wollten. Die vasculäre Hypertonie aber hat mit Nephritis nichts zu tun, und mit voller Absicht sprach ich oben von dem Vorhandensein einer Hyperglykämie bei vasculärer Hypertonie und vermied den Ausdruck der „Hochdrucknephritis“.

E. Münzer[7]) hat gezeigt, daß es sich bei der dauernden

---

[1]) Borchard u. Bennigson, Münch. med. Wochenschr. **60**, 41, 1913.

[2]) J. Bing und B. Jacobson, Ref. Kongreß-Centralbl. 8, 314 und Arch. f. klin. Med. **113**, 1914.

[3]) Port, Deutsche med. Wochenschr. **39**, 1913.

[4]) A. Landau, Rev. de med. **34**, 1914.

[5]) Rolly und Oppermann, diese Zeitschr. **48**, 1913.

[6]) P. Rusca, Gazz. med. ital. **65**, 1914.

[7]) E. Münzer, Die Erkrankungen des Herzgefäßsystems im Lichte moderner Untersuchungsmethoden. Centralbl. f. Herz- u. Gefäßkrankh. **5**, Heft 21 u. 23, 1913.

vasculären Hypertonie überhaupt nicht um eine Nierenerkrankung, sondern um eine Gefäßerkrankung handelt, und zwar um Erkrankung eines großen Teiles der peripheren präcapillaren und capillaren Gefäßgebiete.

Natürlich werden an einer solchen allgemeinen Gefäßerkrankung auch die Nierengefäße stets mehr oder weniger beteiligt sein. „Diese Beteiligung der Nierengefäße an der allgemeinen Gefäßerkrankung ist zu fordern und zu erwarten. Je ausgebreiteter die Gefäßerkrankung, desto größer muß der Blutdruck sein, um so sicherer ist aber auch die Beteiligung der Nierengefäße an der Erkrankung vorauszusagen[1]."

„Die Erkrankung der präcapillaren Arterien und des Capillarsystems stehen im Mittelpunkte des Krankheitsbildes der vasculären Hypertonie, oder mit anderen Worten, die Erkrankung der präcapillaren Arterien und der Capillaren mit nachfolgendem Schwund eines Teiles derselben stellen die Ursache der außerordentlichen Blutdrucksteigerung dar[2]."

Von diesem Gesichtspunkte aus werden nun alle die wechselnden Befunde leicht und gut verständlich, sobald wir nur bedenken, daß an dieser allgemeinen Gefäßerkrankung die verschiedenen Organe beteiligt sein können.

Ergreift die Affektion jene Organe, die am Kohlenhydratstoffwechsel besonders beteiligt sind (chromaffines System, Leber, Pankreas), dann werden Störungen des Blutzuckerspiegels eintreten, an denen vielleicht die durch einen eventuellen Nierengefäßschwund bedingte Nierenschrumpfung insofern beteiligt sein könnte, als sie allein eine gewisse Zuckerdichtigkeit bedingen könnte.

Es wäre noch vielleicht die Frage zu streifen nach der Ursache der allgemeinen Gefäßerkrankung, der dauernden vasculären Hypertonie. Man fand öfters eine Vergrößerung der Nebennieren bei Fällen von vasculärer Hypertonie und nahm hier einen ursächlichen Zusammenhang an. „Da man festgestellt hatte, daß das innere Sekret der Nebennieren, das Adrenalin, vasoconstrictorisch wirkt, schloß man aus der Hypertrophie der Nebennieren in Fällen vasculärer Hypertonie auf

[1] Münzer, l. c. S. 497.
[2] Münzer, l. c. S. 498.

eine Hyperfunktion dieses Organes und nahm an, daß in diesen Fällen die Nebennieren in krankhaft vermehrter Menge Adrenalin erzeugen bzw. ins Blut secernieren und auf diese Weise die dauernde Hypertonie verursachen[1]."

Wir hätten dann in der Erkrankung des chromaffinen Systems nicht die Folge, sondern die Ursache der vasculären Hypertonie, der allgemeinen Gefäßsklerose vor uns und die Verschiedenheit der Symptomatologie dieser Erkrankung wäre, wie Münzer schon ausführte, durch die verschiedene Ausbreitung und anatomische Lokalisation der Gefäßerkrankung bedingt und erklärt. So verlohnend es auch ist, dieser Frage mit ihrer großen Perspektive nachzugehen, liegt es doch außerhalb des Rahmens unserer Untersuchungen.

Uns genügt es, in Übereinstimmung mit E. Neubauer gezeigt zu haben, daß

1. vasculäre Hypertonie (die nichts mit der Nephritis zu tun hat) oft mit Hyperglykämie einhergeht;

2. daß wir in diesen Fällen alimentär häufig Glucosurie hervorrufen können, und

3. darauf aufmerksam gemacht zu haben, daß die Verschiedenheit der Einzelerscheinungen bei vasculärer Hypertonie vielleicht durch die Verschiedenheit der anatomischen Lokalisation der Grunderkrankung — der allgemeinen peripheren Gefäßsklerose — bedingt ist.

---

[1]) Münzer, l. c. S. 496.

Phytobiochemische Studien.

I. Mitteilung.

Von

As. Zlataroff.

(Aus dem Chemischen Institut der Universität Sofia.)

(Eingegangen am 8. April 1916.)

Mit 2 Figuren im Text.

Als Material für die vorliegenden phytobiochemischen Untersuchungen, über die ich im folgenden berichten werde, dienten mir die keimenden Samen von Cicer arietinum L. (Kichererbse, Abb. 1 u. 2), über deren chemische Zusammensetzung ich durch eine frühere Untersuchung[1]) schon orientiert war.

Ich habe zunächst die Umwandlungen eingehend zu verfolgen gesucht, die die einzelnen chemisch definierten Substanzen der Samen während der Keimung erfahren. Ein Teil der gewonnenen Resultate bildet den Inhalt dieser Mitteilung.

1. Allgemeines.

Ich ließ die Samen im Dunkeln über destilliertem Wasser keimen. Nach 3, 6, 10, 20 und 25 Tagen wurden je 100 Keim-

---

[1]) Zlataroff und Stoïkoff, Chemie und Mykologie der Frucht von Cicer arietinum L. Zeitschr. f. Nahrungs- und Genußmittel-Unters. **26**, 242, 1913; Zlataroff, Sur la mycologie du fruit de Cicer arietinum L. Centralbl. f. Bakt. **38**, 584, 1913; Zlataroff, Recherches sur les propriétés et la composition des grains de Cicer arietinum L. Annuaire de l'Université de Sofia **7**, 1912; Zlataroff, Enzymatische und fermentative Eigenschaften der Frucht von Cicer arietinum L. Mitteil. d. bulg. naturwiss. Ges. **5**, 1912; Zlataroff, Bromatologie der Früchte von Cicer arietinum L. Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel (im Druck).

linge bei 50 bis 60° getrocknet, fein gemahlen und bis zum konstanten Gewicht weitergetrocknet:

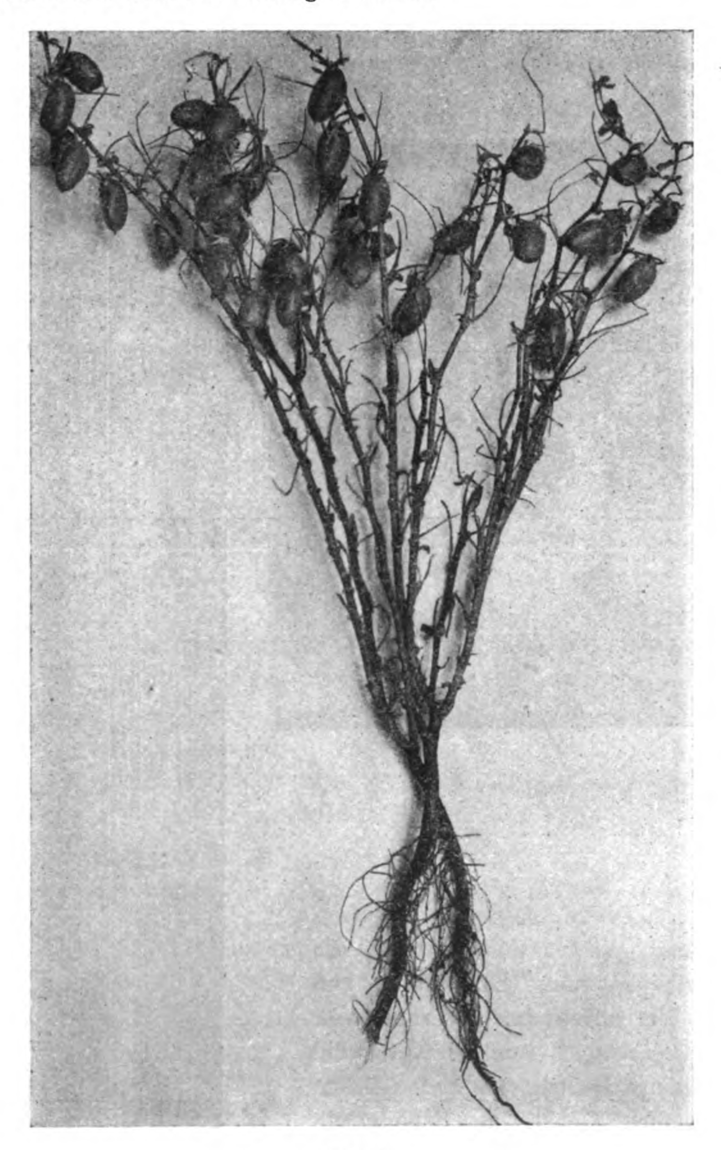
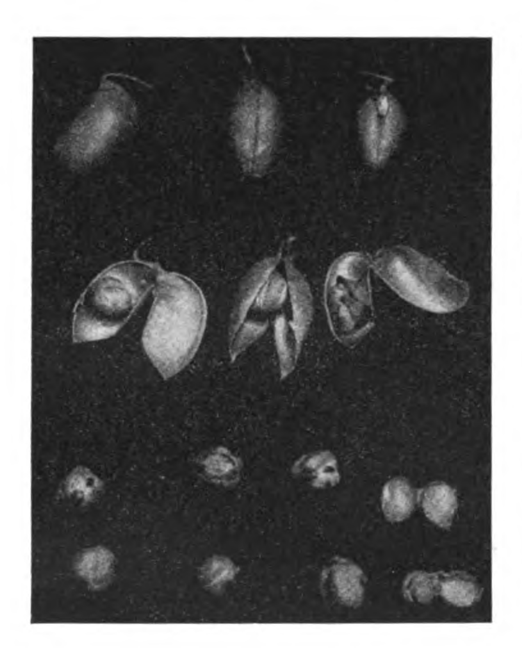


Fig. 1.

a) 100 Samen von Cicer arietinum wiegen 49,25 g. Nach vollständiger Imbibition mit Wasser (nach 3 Stunden) wiegen

die 100 Samen 103,52 g. Das absorbierte Wasser beträgt somit 110,18 %.

b) 100 Samen wiegen 48,20 g. Nach Aufnahme von Wasser wiegen sie 100,50 g. Wasser absorbiert: 108,51 %.



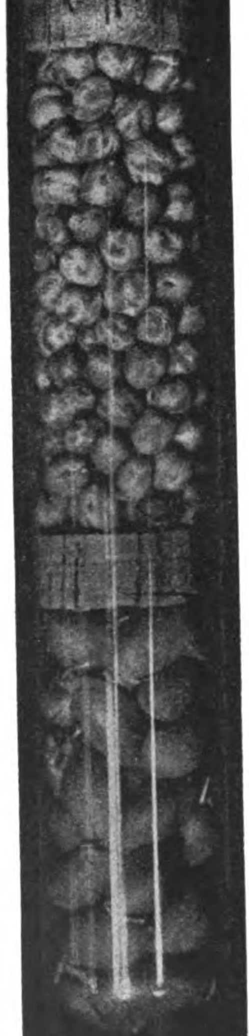


Fig. 2.

Die ausgesprochene Fähigkeit, Wasser aufzunehmen, die die Keimung der Samen von Cicer arietinum natürlich sehr begünstigen muß, hängt wohl hauptsächlich ab von ihrem hohen Gehalt an Schleimsubstanzen und an Lipoiden.

Die beifolgende Tabelle I orientiert über die chemische Zusammensetzung der Samen:

Tabelle I.

Analyse	In 100 g Trockensubstanz sind enthalten								
	Fette g	Stickstoffhaltige Substanzen g	Reinprotein g	N-haltige organische Substanzen g	N-freie Extraktivstoffe g	Stärke g	Rohfaser g	Asche g	Gesamtstickstoff g
1	6,28	20,75	19,06	1,69	63,19	50,28	3,64	2,82	3,32
2	6,29	21,00	19,08	0,92	62,82	50,35	3,61	2,92	3,36
3	6,33	20,88	19,04	1,84	62,94	50,33	3,61	2,90	3,34
Mittel	6,30	20,87	19,06	1,48	62,98	50,32	3,62	2,87	3,34

Über die Zusammensetzung der Asche orientiert Tabelle II:

Tabelle II.

Aschenbestandteile	In °/₀ der Trockensubstanz	In °/₀ der Asche
SiO_2	0,0195	0,68
P_2O_5	0,9905	34,51
CaO	0,2927	10,19
MgO	0,5757	20,06
SO_3	0,1045	3,64
K_2O	0,8145	28,38
Na_2O	0,1182	4,12
FeO	0,0631	2,20
Cl	0,0563	1,96

Die Aschenbestimmungen ergaben für die verschiedenen Perioden der Keimung folgende Werte:

Tabelle III.

Tage	100 Keimlinge, bei 60° getrocknet, wiegen g	In 5 g Trockensubstanz ist enthalten Asche g	Asche in °/₀ der Trockensubstanz
0	45,009	0,1435	2,87
3	42,322	0,1531	3,06
6	40,592	0,1593	3,19
10	38,057	0,1611	3,42
15	37,728	0,1821	3,64
20	30,496	0,2082	4,16
25	30,045	0,2108	4,31

Die Keimlinge hatten also von ihrem anfänglichen Gewicht eingebüßt (berechnet aus den Werten in Spalte 2 der Tabelle III):

Tabelle IV.

Nach Tagen	Gewichtsverlust in % des anfänglichen Gewichts	Gewichtsverlust in % des anfänglichen Gewichts, aus der Zunahme der Asche berechnet
3	5,970	6,21
6	9,81	10,24
10	15,44	16,08
15	20,62	21,15
20	30,03	31,01
25	33,25	33,41

Übereinstimmende Werte (Spalte 3 der Tabelle IV) ergeben sich, wenn man den Gewichtsverlust aus der prozentischen Zunahme des Aschengehaltes berechnet (nach den Werten der Spalte 4 der Tabelle III).

2. Zerfall und Umwandlung der stickstoffhaltigen Substanzen bei der Keimung.

Die ersten systematischen Untersuchungen über die Umwandlungen und den Zerfall der stickstoffhaltigen Substanzen bei der Keimung stammen von Prianischnikoff[1]). Um zu ermitteln, auf welche Weise und mit welcher Geschwindigkeit die N-haltigen Substanzen sich bei der Keimung verändern und zerfallen, wurden folgende Bestimmungen ausgeführt: 1. Gesamtstickstoff, 2. Proteinstickstoff, 3. Nucleinstickstoff, 4. Stickstoff aus Peptonen und organischen Basen, 5. Aminosäurenstickstoff, 6. Stickstoff aus den Amiden der Aminosäuren, 7. Ammoniakstickstoff. Ich hielt mich an diesen Untersuchungsweg von Prianischnikoff.

Die zwei folgenden Tabellen geben ein Bild von der Umwandlung und dem Zerfall der stickstoffhaltigen Substanzen bei der Keimung von Cicer arietinum:

---

[1]) D. N. Prianischnikoff, Zur Kenntnis der Keimungsvorgänge bei Vicia Sativa. Landw. Vers.-Stat. **45**, 265, 1894. — Derselbe, Über den Eiweißzerfall bei der Keimung. St. Petersburg 1895. — Derselbe, Die Eiweißstoffe und deren Umsatz im Pflanzenorganismus. St. Petersburg 1899. — Derselbe, Die Einheitlichkeit des Baues der Eiweißstoffe und ihrer Umwandlungen im pflanzlichen und tierischen Organismus. Russisches Journ. f. experim. Landwirtschaft **13**, 702, 1912.

Tabelle Va.

In % der Trockensubstanz

Tage	0	3	6	10	15	20	25
Gesamtstickstoff	3,40	3,46	3,53	3,66	3,98	4,61	4,82
Eiweißstickstoff	3,05	2,30	1,97	1,80	1,57	1,20	1,53
Nucleinstickstoff	0,100	0,103	0,109	0,122	0,133	0,187	0,206
Ammoniakstickstoff	0,01	0,02	0,02	0,03	0,05	0,05	0,03
Amidstickstoff	0,01	0,40	0,76	0,90	1,48	1,80	2,00
Aminosäurenstickstoff	0,12	0,50	0,54	0,79	0,68	1,24	0,90
Gesamtamidoaminosäurenstickstoff	0,13	0,90	1,30	1,69	2,16	3,04	2,90

Tabelle Vb.

In % des Gesamtstickstoffs

Tage	0	3	6	10	15	20	25
Eiweißstickstoff	91,39	66,47	55,73	49,25	39,45	37,59	31,88
mit Korrektur f.d. Atmung	91,39	62,42	50,14	41,49	31,21	26,12	21,28
Nucleinstickstoff	2,99	2,98	3,11	3,33	3,58	4,06	4,31
mit Korrektur	2,99	2,80	2,80	2,80	2,83	2,84	2,85
Ammoniakstickstoff	0,30	0,58	0,57	0,80	1,25	1,22	0,62
mit Korrektur	0,30	0,55	0,51	0,70	0,99	0,95	0,41
Amidstickstoff	0,30	11,15	21,50	24,50	37,90	39,00	41,50
mit Korrektur	0,30	10,90	19,40	20,70	29,40	27,10	27,70
Aminosäurenstickstoff	1,59	14,15	15,30	21,60	18,20	26,90	18,17
mit Korrektur	1,59	13,60	13,80	18,20	17,10	18,70?	12,50
Gesamtamidoaminosäurenstickstoff	1,89	25,65	36,80	39,80	56,10	65,90	60,20
mit Korrektur	1,89	24,50	33,20	38,90	46,50	45,80	40,20
Peptonstickstoff	0,21	—	—	0,49	—	—	0,43

Aus den Tabellen ist ersichtlich, daß bei der Keimung ein schneller Zerfall der Proteine stattfindet. Nach 25 Tagen ist der Proteingehalt auf $^1/_3$ des Anfangsgehaltes gesunken. Auf Kosten der Proteine vermehren sich die Aminosäuren und deren Amide.

Der Nucleingehalt bleibt fast unverändert.

Der Gehalt an Ammoniakstickstoff ist so gering, daß man wohl annehmen kann, das Ammoniak entstehe erst sekundär aus anderen N-haltigen Zerfallsprodukten der Proteine.

Über die Umwandlungen der Nucleoproteide und Nucleoalbumine bei der Keimung werde ich eingehender in einer späteren Mitteilung berichten. Die Untersuchungen sind noch im Gange.

3. Umwandlung der phosphorhaltigen Substanzen bei der Keimung.

Die phosphorhaltigen Stoffe spielen zweifellos eine weitgehende Rolle im Leben der pflanzlichen Zelle, und zahlreiche Autoren haben sich mit der Frage über den Umsatz des Phosphors in der pflanzlichen Zelle befaßt. Jedoch tragen die meisten dieser Untersuchungen einen mehr oder weniger zufälligen Charakter. Systematisch hat in dieser Richtung hauptsächlich L. Iwanoff[1]) gearbeitet. Von ihm stammen auch einige neue Methoden zur P-Bestimmung in Samen und Keimlingen.

Um die biologische Rolle zu erfassen, die den phosphorhaltigen Substanzen im Leben der Pflanzen zukommt, sollte man die letzteren unter Bedingungen keimen lassen, die die funktionellen Beziehungen der einen oder anderen Substanz möglichst klar hervortreten ließen. Auf diese Weise wird man wohl einen tieferen Einblick in die verwickelten biochemischen Vorgänge gewinnen und die biochemischen Beziehungen der in der Pflanze vorkommenden Stoffe erkennen. Die Versuche, die ich in dieser Richtung ausgeführt habe, werde ich weiter unten besprechen.

Außer 1. dem Gesamtphosphor, bestimmte ich 2. den anorganischen Phosphor (Phosphate), 3. den Lecithinphosphor, 4. den Proteinphosphor und 5. den Phosphor aus den löslichen organischen Verbindungen (Phytin).

Die folgenden Tabellen orientieren uns über die Umwandlungen der phosphorhaltigen Substanzen bei der Keimung im Dunkeln:

Tabelle VIa.

In $^0/_0$ der Trockensubstanz

Tage	0	3	6	10	15	20	25
Gesamt-P_2O_5	0,998	1,069	1,100	1,172	1,268	1,430	1,510
Anorganische P_2O_5	0,118	0,460	0,711	0,811	0,989	1,121	1,244
Lecithin-P_2O_5	0,142	—	0,113	0,115	—	0,128	0,129
Eiweiß-P_2O_5	0,486	0,401	0,313	0,244	—	0,162	0,170
Lösliche organische P_2O_5	0,244	0,102	0,021	0,012	0,032	0,038	0,041

[1]) L. Iwanoff, Die phosphorhaltigen Stoffe und deren Umsatz im pflanzlichen Organismus. St. Petersburg 1905.

Tabelle VIb.

In °/₀ der Gesamt-P_2O_5

Tage	0	3	6	10	15	20	25
Anorganische P_2O_5	11,82	43,24	64,64	67,63	78,00	78,39	82,38
mit Korrektur f. d. Atmung	11,82	40,61	58,16	56,97	61,71	54,49	54,92
Lecithin-P_2O_5	14,23	—	10,04	9,81	—	8,95	8,54
mit Korrektur	14,23	—	9,03	5,89	—	6,22	5,69
Eiweiß-P_2O_5	48,70	37,69	28,85	20,82	—	11,33	11,26
mit Korrektur	48,70	35,40	25,96	17,54	—	7,87	7,51
Lösliche organische P_2O_5	24,45	9,59	1,91	1,03	2,52	2,66	2,72
mit Korrektur	24,45	9,01	1,72	0,868	1,99	1,85	1,81

Aus den mitgeteilten Werten ersieht man, daß ein großer Teil des Eiweißphosphors und fast der gesamte Phytinphosphor Reservephosphor darstellen. Das Lecithin dagegen scheint nicht ausschließlich Reservesubstanz zu sein. Bei der Keimung vermehrt sich der anorganisch gebundene Phosphor auf Kosten des Eiweißphosphors und namentlich auf Kosten des löslicheren organisch gebundenen Phosphors. Das Phytin spielt bei der Pflanze augenscheinlich nur die Rolle einer Reservesubstanz.

Die Verteilung des Lecithins auf die Kotyledonen und den Sproß in der keimenden Pflanze zeigt uns die folgende Tabelle an:

Tabelle VII.

Tage	6	15	25
P_2O_5 in den Kotyledonen in g	0,032	0,028	0,013
" " " " in °/₀ der Lecithin-P_2O_5 des ganzen Keimlings	28,57	24,14	10,92
P_2O_5 in dem Sproß in g	0,080	0,090	0,105
" " " " in °/₀ der Lecithin-P_2O_5 des ganzen Keimlings	71,43	75,86	89,08

Alle in der Tabelle VII erwähnten Werte beziehen sich auf ein Material, das im Dunkeln über destilliertem Wasser keimte.

Der Lecithinphosphorgehalt der Samen, die unter verschiedenen Bedingungen keimten, betrug:

Tabelle VIII.

Tage	0	3	6	10	15	20	25
Gekeimt über destilliertem Wasser bei Tageslicht[1]	0,142	—	0,148	—	—	0,179	0,211
In % der Gesamt-P_2O_5	14,23	—	10,69	—	—	12,52	13,98
Gekeimt über einer Lösung von Ammonium-Glycerophosphat im Dunkeln	0,142	—	—	—	0,121	—	0,122
Gekeimt über einer Lösung von Ammonium-Glycerophosphat bei Tageslicht	0,142	—	—	—	0,175	—	0,224
Gekeimt über einer Emulsion von Lecithin im Dunkeln	0,142	—	—	—	0,128	—	0,131
Gekeimt über einer Emulsion von Lecithin bei Tageslicht	0,142	—	—	—	0,181	—	0,233
Gekeimt über einer Lösung von Glucose im Dunkeln	0,142	—	—	—	0,136	—	0,135
In % der Gesamt-P_2O_5	14,23	—	—	—	10,70	—	8,94

Aus diesen Beobachtungen kann man mit Sicherheit schließen, daß das Lecithin als solches von überaus großer Bedeutung für den Ablauf der Funktionen der Pflanze ist: das Lecithin tritt uns nicht nur als Reservesubstanz entgegen, sondern behält seinen chemischen Charakter während der Keimung unverändert bei[2]).

[1]) Wo nicht besonders hingewiesen — in Prozenten der Trockensubstanz.

[2]) Es liegen hier augenscheinlich andere Verhältnisse vor als bei der Entwicklung des tierischen Organismus im dotterreichen Ei. Plimmer hat gezeigt, daß der Lecithinphosphor bei der Entwicklung des Hühnchens restlos für den Aufbau der Nucleine und für die Anforderungen des Skeletts an anorganischem Phosphor verbraucht wird. Dagegen kommt den Nucleoalbuminen der pflanzlichen Samen augenscheinlich dieselbe biochemische Funktion zu wie den Nucleoalbuminen im Tierreich. Nach den Untersuchungen von Plimmer über den Abbau der phosphorhaltigen Substanzen durch die Fermente des Darmkanals unterliegt es keinem Zweifel mehr, daß der Caseinphosphor im Darme zum großen Teil als anorganischer Phosphor abgespalten wird. Auch ist es sehr wahrscheinlich, daß der wachsende Säugetierorganismus seinen Bedarf an Phosphaten für den Aufbau der Knochen mit Caseinphosphor zu decken vermag. (Untersuchungen von W. Heubner und Alex. Lipschütz. Vgl. darüber Lipschütz, Die biologische Bedeutung des Caseinphosphors. Arch. f. d. ges. Physiol. **143**, 1911.) Bezüglich des Befundes von Plimmer, daß der Lecithinphosphor zu Zwecken des Aufbaus der Nucleine und für den Bedarf des Skeletts an Phosphaten ver-

Es wäre daran zu denken, ob nicht das Lecithin ein „bioplastisches“ Agens, wenn man so sagen darf, darstelle, indem es sich am Baustoffwechsel, an den Assimilationsprozessen der Pflanze beteilige. Auch daran könnte man denken, daß es an der Atmung der Pflanze chemisch teil habe.

Daß das Lecithin die Wachstumsintensität zu steigern vermag, zeigt folgende Beobachtung. Läßt man Samen von Cicer arietinum bei Tageslicht über einer Emulsion von Lecithin, aus Samen von Cicer arietinum von mir isoliert, keimen, so wachsen die Keimlinge zwei- bis dreimal so schnell als über destilliertem Wasser. Diese Beobachtung deckt sich vollkommen mit den bekannten Befunden von Danilewski an Kaulquappen.

Man könnte daran denken, daß das Lecithin anregend auf die Chloroplasten wirkt oder daß das Lecithin in mehr direkter Weise an den Assimilationsprozessen in der Pflanze (Aufspaltung in Kohlensäure) beteiligt ist. Diese Auffassung wird auch von Stoklasa[1]) vertreten. Eine Anteilnahme des Lecithins an den Atmungsprozessen wäre vielleicht aus folgender Beobachtung abzuleiten. Läßt man Samen von Cicer arietinum über Glucose keimen, so erweist sich die Menge des Lecithins in diesen Samen größer als in denjenigen, die über destilliertem Wasser keimten (vgl. Zeile 3 der Tabelle VIb und die letzte Zeile von Tabelle VIII). Schon Loew[2]) hatte die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß das Lecithin an der Verbrennung der Fette in der Pflanze Anteil nimmt. Aber sein Hinweis blieb damals unbeachtet.

Die Beziehungen des Lecithins zum Wachstum der Pflanze könnte man als einen biochemischen Ausdruck eines Falles deuten, wo die Funktion sich das Organ zu schaffen weiß.

---

braucht wird, darf jedoch nicht vergessen werden, daß vielleicht die Annahme von Barbieri zu Recht besteht, nach der das Eierlecithin nichts anderes darstellt als ein Gemisch von Tripalmitin, Oleopalmitin, Ovochromin und alkalischen Metaphosphaten. (Vgl. Compt. rend. Soc. Biol. **155**, 312.)

[1]) Stoklasa, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **29**, 3, 2761, 1896; Zeitschr. f. physiol. Chem. **25**, 398, 1898. — Sitzungsber. d. Wien. Akad. **104**, 1. X. 1896; **104**, 1. VII. 1895.

[2]) Loew, Biol. Centralbl. **1891**, 271.

Beim Keimen über Glucose soll Zucker verbrannt werden, und für das Zustandekommen dieser biochemischen Funktion bedürfe es der Anteilnahme eines bestimmten Organs im biochemischen Sinne. Das sich in vermehrter Menge über Glucose bildende Lecithin wäre eines dieser „Organe".

Diese Schlüsse würden mehr Überzeugungskraft besitzen, wenn in Parallele zu meinen Untersuchungen auch eingehende Versuche und Analysen über den Gehalt der Pflanze an den anderen phosphorhaltigen Stoffen ausgeführt würden, namentlich über den Gehalt an Nucleoproteiden.

Die Synthese des Lecithins steht augenscheinlich in direkter Abhängigkeit vom Licht. Diese Beziehungen der Lecithin-Synthese zum Licht werden uns durch die Beobachtung illustriert, daß die Hauptmenge des Lecithins sich in den grünen Teilen des bei Licht gewachsenen Keimlings findet.

Über die Chemie des Lecithins der Samen von Cicer arietinum werde ich in einer späteren Mitteilung berichten.

Kritisch-experimentelle Untersuchungen über Abderhaldens „spezifische" Abwehrfermente.

Von

Berthold Oppler.

(Aus der Kgl. Medizinischen Poliklinik in München.)

(Eingegangen am 28. März 1916.)

1. Teil[1]).

Einleitung.

Trotz zahlreicher Untersuchungen, die Abderhaldens Lehre von den spezifischen Abwehrfermenten gezeitigt hat, ist eine Einigung der Ansichten weder hinsichtlich ihrer wissenschaftlichen Berechtigung, noch ihrer praktischen Bedeutung bisher erzielt worden.

Die „spezifische Schwangerschaftsreaktion", die den Brennpunkt der Lehre bildet, wurde von Abderhalden ent-

---

[1]) Der erste Teil dieser Mitteilungen war im wesentlichen vor dem Erscheinen der 4. Auflage der „Abwehrfermente des tierischen Organismus" experimentell bereits abgeschlossen. Durch den Kriegsausbruch erfuhr die Fertigstellung der Arbeit eine fast anderthalbjährige Unterbrechung. Besondere Verhältnisse, die in dem Entwicklungsgang der Abderhaldenschen Methodik begründet sind und in den nachfolgenden Darlegungen sich deutlich wiederspiegeln, ließen es zweckmäßig erscheinen, die umfangreiche Literatur nur in beschränktem Maße zu benützen. Ein großer Teil der das Ergebnis eigener Untersuchungen somit darstellenden Tatsachen ist von anderen Forschern inzwischen veröffentlicht worden, die jedoch vielfach von anderen Gesichtspunkten ausgingen und sich anderer Methoden bedienten. Wenn die Nennung der betreffenden Autoren vielfach unterblieb, so möge das durch die infolge der Zeitumstände beschränkte Arbeitszeit und den ungewöhnlichen Umfang der Literatur gütigst entschuldigt werden. Einige neuere Mitteilungen aus Abderhaldens Institut machten, da eine Umarbeitung untunlich erschien, die Anfügung eines zweiten Teiles notwendig.

gegen seinen Erwartungen auf empirischem Wege gefunden[1]), von anderen Forschern in Theorie und Praxis verworfen, als sich herausstellte, daß Placenta auch durch das Serum von sicher niemals geschwängerten Personen abgebaut wird. Die Mitte zwischen diesen Extremen halten eine Reihe von Forschern, die zwar die Existenz einer Schwangerschaftsreaktion und ihre praktische, diagnostische Bedeutung anerkennen, dagegen ihre Spezifizität leugnen und in der Reaktion lediglich die quantitative Steigerung einer dem Serum allgemein zukommenden Eigenschaft erblicken. Die Tatsache, daß die Reaktion bei Einwirkung des Serums nicht geschwängerter Personen auf Placenta beobachtet wird, bestreiten auch Abderhalden und die Anhänger seiner Lehre nicht, aber sie erklären diese „scheinbar" nicht spezifischen Reaktionen aus Mängeln der Dialysierhülsen und Organsubstrate, sowie aus der Einwirkung anderer als der erwarteten, aber trotzdem spezifischen Abwehrfermente.

Für die Annahme einer spezifischen Schwangerschaftsreaktion überhaupt und ihrer Spezifizität als Grundlage der Lehre von den spezifischen Abwehrfermenten im weiteren Sinne bildet daher der positive Beweis, daß diese scheinbar nicht spezifischen Reaktionen in Wirklichkeit streng spezifischer Natur, bzw. das Ergebnis von Versuchsfehlern sind, die unumgänglich nötige Voraussetzung.

Abderhalden hat nun Versuche veröffentlicht[2]), die als Beweis in gedachter Richtung seitdem besondere Bedeutung erlangt haben.

Damals lag bereits die 3. Auflage der „Abwehrfermente" vor. Die Mitteilung erschien demnach zu einer Zeit, als die Lehre Abderhaldens in allen wesentlichen Punkten schon längst abgeschlossen war. Aus dieser Mitteilung geht zweifelsfrei hervor, daß Abderhalden das Vorkommen „eines ganzen Gemenges spezifischer Abwehrfermente" in ein und demselben Serum als Annahme zwar für möglich hält, aber als Tatsache in mehr als 600 Fällen von Schwangerschaftsdiagnosen und über 400 der verschiedensten pathologischen Fälle nicht

[1]) Abwehrfermente 3. Aufl., S. 88—89, 93.

[2]) Münch. med. Wochenschr. **1913**, S. 2774.

bestätigen konnte. Die Wirkung „polyvalenter"[1]) Sera als Erklärung „scheinbar" nicht spezifischer Reaktionen scheidet daher für die bis zum Erscheinen der angeführten Mitteilung beobachteten Fälle endgültig aus. Abderhalden teilt dann weiterhin 100 Parallelversuche an bluthaltigen und blutfreien Organen mit, als Beweis dafür, daß der Gehalt des Serums an spezifischen Abwehrfermenten, die gegen Bestandteile der roten Blutkörperchen eingestellt sind, bei Anwendung mangelhaft ausgewaschener Organe eine der Hauptfehlerquellen des Dialysierverfahrens darstelle. In allen diesen Fällen handle es sich um spezifische Reaktionen: „Unzweifelhaft ist in keinem einzigen dieser Fälle das betreffende Organeiweiß zum Abbau gelangt, sondern es wurden jedesmal Blutbestandteile hydrolysiert. Es wäre sonst nicht zu verstehen, weshalb die blutfreien Organe keine Spur eines Abbaues zeigten. Selbstverständlich täuschen solche Befunde leicht unspezifische Reaktionen vor. In den Fällen, in denen die bluthaltigen Organe einen Abbau ergaben, muß das angewandte Serum Abwehrfermente besessen haben, die auf Blutbestandteile eingestellt waren."

Betrachtet man indessen diese Versuchsreihe zunächst einfach nach ihren Ergebnissen und ohne Rücksicht auf die von Abderhalden gegebene Deutung, so finden sich darunter nicht weniger als 19 Ausnahmen, die als nicht spezifische Reaktionen zu betrachten sind. Da diese 100 Versuche nur eine Auswahl aus einer „sehr großen Zahl" der überhaupt ausgeführten Versuche darstellen, ihre Gesamtzahl aber unbekannt ist, so kann dem hohen Prozentsatz der stimmenden Versuche nur ein bedingter Wert beigelegt werden.

Noch schwerer aber und bestimmend für die Entscheidung, ob diese „scheinbar" nicht spezifischen als in Wirklichkeit spezifische Reaktionen anzusehen sind, wiegen jedoch die Bedenken, die sich gegen die Logik der Beweisführung geltend machen. Um diese 19 Ausnahmen als nur „scheinbar" unspezifisch erklären zu können, sucht und findet Abderhalden „spezifische" Abwehrfermente, die auf die betreffenden Organe eingestellt sind, übersieht dabei aber vollständig, daß diese Deutung über-

[1]) Abwehrfermente, 4. Aufl., S. 146.

haupt verständlich und zulässig nur dann ist, wenn man die Existenz und Spezifizität der Schwangerschaftsreaktion wiederum als bereits sicher bewiesene Tatsache voraussetzt. Nur in dem geänderten Gewand einer „scheinbar“ nicht spezifischen Reaktion kehrt die bestrittene, spezifische Schwangerschaftsreaktion, die ja das eigentliche Ziel des Beweises in letzter Linie bildet, hier als Voraussetzung des Beweises durch eine Hintertür zurück. Die Beweisführung Abderhaldens bewegt sich im Kreise, und seine Erklärung der „scheinbar“ nicht spezifischen Reaktionen gibt sich somit ohne weiteres als eine Hypothese zu erkennen. Damit verlieren alle weiteren Schlußfolgerungen ihre Bedeutung. Die Lehre Abderhaldens ist also auf ihren Ausgangspunkt zurückgekehrt. Es ist von neuem zu untersuchen, ob es eine spezifische Schwangerschaftsreaktion gibt. Abderhaldens Lehre und Methodik bilden eine untrennbare Einheit, letztere stellt die logische Schlußfolgerung seiner Theorie dar. Die Erkenntnis, daß die scharfe Trennungslinie zwischen Hypothese und Tatsache verwischt wurde, erfordert daher als erste Aufgabe, die Methodik von allem hypothetischen Beiwerk zu befreien. Wurde sie folgerichtig entwickelt, so muß sie imstande sein, die theoretischen Folgerungen, die sich ergeben, wenn man Abderhaldens Hypothese als richtig voraussetzt, im Versuche zu verwirklichen. Andererseits müssen die vermittels der Abderhaldenschen Methode festgestellten Tatsachen der Prüfung standhalten, wenn man auf sie die allgemein gültigen, chemischen und physikalischen Gesetze der Fermentlehre in Anwendung bringt. Dagegen scheidet, wie scharf betont werden muß, die Tatsache, daß man vermittels der Abderhaldenschen Methodik die Diagnose der Schwangerschaft in einer großen Zahl von Fällen gestellt hat, als Beweis für die Richtigkeit seiner Lehre vollständig aus. Sie bildet zunächst nur ihre Vorbedingung. Die praktische Verwertbarkeit ergibt sich zwar dann als notwendige Folgerung der richtigen Theorie, beweist an sich jedoch noch nicht, daß Abderhaldens Erklärung der Tatsachen die richtige ist. Gerade auf diese kommt es aber an, sie ermöglicht erst jene Verallgemeinerung, die der Lehre Abderhaldens ihre hohe Bedeutung verleiht.

Vom rein experimentellen Standpunkt aus betrachtet, läßt sich nun der Kern der Abderhaldenschen Lehre in einen

Satz zusammenfassen: „Das spezifische Schwangerschaftsferment baut das spezifische Substrat der Placenta über ein kolloidales Zwischenstadium zu Polypeptiden und Aminosäuren ab."

Die experimentelle, sichere Grundlage der Lehre von den spezifischen Abwehrfermenten bildet daher der Nachweis von Ferment und Abbauprodukten durch Isolierung und Charakterisierung dieser Substanzen.

Im Gegensatz zu den sicher nachgewiesenen Abbauprodukten werden indessen hinsichtlich des Schwangerschaftsferments auch die überzeugtesten Anhänger der Lehre Abderhaldens ohne weiteres zugeben, daß dieser direkte Beweis seiner Existenz bisher nicht geführt, vielmehr lediglich auf indirektem Wege mit mehr oder weniger großer Wahrscheinlichkeit aus den Wirkungen erschlossen worden ist. Lange[1]) u. a. machen mit vollem Recht den Einwurf, daß die Resistenz der Abderhaldenschen Fermente gegenüber hohen Temperaturen sich mit den Tatsachen, die bisher über Fermente bekannt geworden sind, nur schwer vereinen lasse.

Dem direkten Nachweis sind aber im Gegensatz zum Ferment die dialysablen Abbauprodukte, nämlich Polypeptide und Aminosäuren, durch Emil Fischers Methoden zugänglich gemacht worden. Die Isolierung dieser Substanzen aus dem Dialysat einer durch Schwangerenserum abgebauten Placenta wäre daher die erste Vorbedingung einer sicheren, experimentellen Grundlage, aber nicht die einzige. Durchaus berechtigt ist der Einwand Deetjens, daß Aminosäuren auch unter anderen Bedingungen im Blute vorkommen und ihr Nachweis an sich nicht darauf schließen lasse, daß sie auch im Serum durch Abbau des Organsubstrats entstanden seien. Dieser Punkt ist aber entscheidend. Für die Beurteilung der Sachlage ist es daher von ausschlaggebender Bedeutung, daß Abderhalden diesen Einwendungen zwar die Behauptung, den geforderten Nachweis erbracht zu haben, entgegenstellt, dagegen die angekündigte Veröffentlichung seines Beweismaterials bisher nicht verwirklicht hat. Er teilt zwar neuerdings Versuche mit[2])

---

[1]) Diese Zeitschr. **61**, 193.

[2]) Fermentforschung I, **1**, S. 20.

bei denen er vermittels des Verfahrens von van Slyke Amino-N im Dialysat gefunden hat. Jedoch kann diesen Versuchen keine zwingende Beweiskraft zuerkannt werden aus Gründen, die erst an späterer Stelle — cf. optische Methode und zweiter Teil — verständlich werden. Davon abgesehen, ist die genannte Methode so schwierig durchzuführen, daß man, um überhaupt sichere Ausschläge zu erhalten, eine Methodik anwenden muß, die von dem vorgeschriebenen Verfahren in der Wahl einer erheblich größeren Serummenge abweicht.

Als Schnellmethode ist das Verfahren nicht anwendbar.

Um nachzuweisen, daß die Abbauprodukte mit Polypeptiden und Aminosäuren identisch sind, wurden nacheinander eine ganze Reihe von Methoden herangezogen, von denen jedoch nur die nachfolgenden eine allgemeine Verbreitung und Billigung von seiten Abderhaldens gefunden haben:

1. Das Dialysierverfahren in Verbindung mit der Biuretreaktion, Ninhydrinprobe und Mikro-N-Bestimmung.
2. Das Ausfällungsverfahren in Verbindung mit der Mikro-N-Bestimmung.
3. Die optische Methode.
4. Die interferometrische Methode.

Das zuletzt genannte Verfahren läßt hinsichtlich der chemischen Natur der Spaltprodukte überhaupt keinen Schluß zu. Es zeigt lediglich an, daß in dem Reaktionsgemisch eine Konzentrationsänderung stattgefunden hat. Für vorliegende Mitteilung kam das Verfahren gar nicht in Frage, weil die Versuche größtenteils bereits abgeschlossen waren, als Hirschs erste Mitteilung erschien. Man wird an seine Verwendung erst dann herantreten, wenn zuvor der Nachweis erbracht ist, daß wir die Spaltprodukte als Polypeptide und Aminosäuren betrachten müssen (cf. zweiter Teil, II).

Die Charakterisierung der Spaltprodukte erfordert den Nachweis, daß sie Stickstoff enthalten. Durch die Mikro-N-Bestimmung ist dieser Beweis zweifelsfrei erbracht worden. Darüber hinaus erkennt aber auch Abderhalden dem Verfahren keinerlei Bedeutung zu[1]). Es gelten für dessen weitere Verwendung demnach die gleichen Gesichtspunkte wie für die Wahl der inter-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **81**, 493.

ferometrischen Methode. Da weiter das Ausfällungsverfahren nur in Verbindung mit der Mikro-N-Bestimmung benützt werden soll, so fällt auch dieses Verfahren zunächst fort, und es bleiben demnach allein das Dialysierverfahren (in Verbindung mit Biuretreaktion bzw. Ninhydrinprobe) sowie die optische Methode übrig, die Abderhaldens eigentliches Werkzeug beim Aufbau und Hauptwaffe im Kampf um seine Lehre bilden.

In der natürlichen Entwicklung und in dem Wesen dieser Lehre[1]) ist es begründet, daß die bei gleichzeitiger Benützung beider Verfahren gewonnenen Ergebnisse unter allen Umständen Übereinstimmung aufweisen müssen und daß allein diese gleichzeitige Übereinstimmung die Spaltprodukte einwandsfrei charakterisiert. Das wird im einzelnen nachgewiesen werden. Als die zuverlässigere von beiden Methoden und deshalb unbedingt beweiskräftige ist nach Abderhaldens Angaben die optische Methode zu betrachten. Trotzdem ist die Zahl der Untersuchungen, die mit letzterer unternommen wurden, relativ klein, verschwindend aber die Zahl jener, bei denen gleichzeitig beide Methoden angewandt wurden. Erst in Arbeiten jüngeren Datums begegnet man der optischen Methode häufiger und findet Hand in Hand damit die Stimmen derer in Zunahme begriffen, welche die Richtigkeit der Angaben Abderhaldens hinsichtlich ihrer Leistung bestreiten. Es kann demnach ein Zweifel darüber nicht bestehen, daß beide Methoden gleichzeitig in Anwendung gezogen werden müssen.

I. Das Dialysierverfahren.

A. Kritik des Verfahrens.

Der Nachweis der Abbauprodukte erfolgte im Dialysierverfahren ursprünglich allein vermittels der Biuretreaktion. Ihr positiver Ausfall im Dialysat ist, da die Bedingungen des Versuches (Hülsen!) so gewählt werden, daß die biureten Stoffe des Serums nicht dialysieren können, als ein zweifelloser Beweis dafür anzusehen, daß die Abbauprodukte Eiweißspaltstücke im Sinne Abderhaldens darstellen. Man könnte daher, vorausgesetzt, daß aus den Organsubstraten keine biureten, diffusions-

[1]) Ebenda 77, 256.

fähigen Stoffe an das Dialysat abgegeben werden, Serum und Organ in jeder beliebigen Menge anwenden und würde eine positive Reaktion doch nur dann erzielen, wenn ein Abbau erfolgt. Die Biuretreaktion zeigt somit das charakteristische Verhalten einer qualitativen Reaktion.

Das Ninhydrin ist unter den Bedingungen des Dialysierversuchs nach Abderhaldens Ansicht ein Reagens auf die α-Aminocarboxylgruppe und daher charakteristisch für Eiweiß-Spaltprodukte. Indessen haben einerseits Halle, Löwenstein und Přibram[1]) und andererseits Neuberg[2]) von verschiedenen Gesichtspunkten aus gezeigt, daß die Ninhydrinreaktion an sich vieldeutig ist. Ihre Anwendung zur Charakterisierung der Dialysate als ausschließliche Reaktion an Stelle der Biuretreaktion ist daher nur dann zulässig, wenn Täuschungen irgendeiner Art mit Sicherheit auszuschließen sind. Nach Abderhalden ist das der Fall, weil die geringe Konzentration der in Betracht kommenden Substanzen ihren Nachweis verhindert. Das mag für die Versuchsbedingungen der zuerst genannten Forscher (Halle, Löwenstein und Přibram) und für jeden einzelnen der aufgefundenen, reaktionsfähigen Stoffe zutreffen, ob auch bei Gegenwart eines Gemenges mehrerer derselben, ist jedoch nach Neubergs Versuchen wenig wahrscheinlich, zumal Abderhalden selbst angibt, daß der NH_3-Gehalt des Serums allein schon den Ausfall der Reaktion beeinflussen kann. Der Ersatz der Biuretreaktion durch die Ninhydrinprobe verlangt daher zum wenigsten, daß beide eindeutig stets das gleiche Ergebnis zeitigen. Abderhalden behauptet das und hielt sich deshalb für berechtigt, die Ninhydrinprobe an ihre Stelle zu setzen. Andere Autoren bestreiten diese Berechtigung. Die Möglichkeit, daß diese im Rechte sind, liegt vor, weil zwischen Biuretreaktion und Ninhydrinprobe hinsichtlich ihrer Anwendungsart und ihres Geltungsbereichs Unterschiede bestehen.

Der Unterschied in der Anwendungsart ist nach dem eben Gesagten leicht verständlich. Da das Serum an sich dialysable, mit Ninhydrin reagierende Stoffe stets enthält, die ohne Einführung von Fehlerquellen sich nicht aus dem Dialysat entfernen lassen, so hat man von vornherein eine gewisse Menge mit

[1]) Diese Zeitschr. 55, 357.

[2]) Diese Zeitschr. 56, 501.

Ninhydrin reagierender Substanz im Dialysat, die, wenn man sie auch noch so klein wählt, stets größer als Null ist. Die Probe kann daher niemals einen negativen Abbau anzeigen, sondern bestenfalls angeben, daß die Abbauprodukte einen bestimmten Wert nicht überschreiten. Je nachdem man diesen Wert bestimmt, kann die Reaktion eine relative oder absolute, quantitative Bestimmungsmethode darstellen. Als solche kann sie ausschließlich verwertet werden, und danach sind die Versuchsbedingungen einzurichten. Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Reaktionen besteht in ihrem Geltungsbereich.

Im Gegensatz zur Ninhydrinprobe versagt nämlich die Biuretreaktion mit sämtlichen Aminosäuren und einer Anzahl von Polypeptiden.

Die Grenze liegt etwa bei den Tripeptiden. Nicht nur alle praktisch in Betracht kommenden löslichen Eiweißkörper, Albumosen und Peptone geben Biuretreaktion, sondern auch alle bisher bekannten Tetrapeptide, ein großer Teil der Tripeptide und eine Reihe von Dipeptiden. Es läßt sich feststellen, daß der Eintritt der Reaktion von der Art und Reihenfolge in der Verkettung der das Polypeptid aufbauenden Aminosäuren abhängig ist. Die beherrschenden Gesetze sind nur teilweise bekannt. Alle diese Verbindungen und auch die übrigen, einschließlich der Aminosäuren, reagieren gleichzeitig aber auch mit Ninhydrin. Der Abbau eines isoliert gedachten, spezifischen Eiweißmoleküls müßte demnach so verlaufen, daß jede einzelne Abbaustufe befähigt ist, gleichzeitig mit beiden Reagentien positiv zu reagieren bis zu dem Augenblick, wo die Biuretreaktion ziemlich plötzlich versagte. Dieser Moment würde dem natürlichen Ende des Abbauprozesses sehr nahe liegen. Denn wenn ein Tetrapeptid weiter gespalten wird, so kann es nur in Dipeptid + Dipeptid oder in Tripeptid + Aminosäure zerfallen. Eine negative Biuretreaktion würde bei positiver Ninhydrinprobe beobachtet werden. Dieser Fall läßt sich aber, soweit es sich dabei zunächst nur um die Qualität der Abbaustufen handelt, leicht ausschließen. Man unterbricht eben einfach den Prozeß vorher. Die Gewähr, daß das geschehen ist, erhalten wir, wenn ein Überschuß von Substrat gewählt und gleichzeitig festgestellt wird, daß das Ferment beim Abbrechen des Versuchs noch wirksam war. Darüber unterrichtet die optische Methode. Da diese

nämlich von vornherein an einem vorgeschritteneren Stadium des Abbaus angreift, im übrigen aber einen identischen Prozeß verfolgt — sie führte ja zur Entdeckung der Schwangerschaftsreaktion — und schließlich 24 Stunden mindestens durchgeführt wird gegenüber einer 16 bis 20 stündigen Dialyse, so muß das Ferment bei Abbruch des Dialysierversuchs noch wirksam gewesen sein, wenn die optische Methode nach 24 Stunden noch einen fortschreitenden Abbau erkennen läßt. Denkt man sich nun den Versuch wie beim Ausfällungsverfahren ohne Hülse in einem Kölbchen vorgenommen, so wird man natürlich alle möglichen Arten von Molekülen gleichzeitig nebeneinander antreffen, aber jede einzelne Abbaustufe zwischen Organ-Eiweiß und Aminosäure muß vorhanden sein, so lange noch Überschuß von Substrat vorhanden ist.

Können unter diesen Bedingungen beide Reaktionen gleichsinnig ausfallen?

Würde der Versuch statt einfach im Kölbchen als richtiger Dialysierversuch in der Hülse ausgeführt, so hängt das ab von der Art und Menge der im Dialysat vorhandenen Abbauprodukte, von der Empfindlichkeit der Nachweisreaktionen und der Durchlässigkeit der Hülsen. Hinsichtlich Art und Menge der Abbauprodukte kann man mit Sicherheit aussagen, daß man nur denjenigen Teil von ihnen wird nachweisen können, den die Hülsen durchlassen. Vom Nachweis ausgeschlossen sind nun nach Abderhalden alle kolloidalen Abbaustufen, nachweisbar nur die Krystalloide.

Die Reaktionen werden mit gleichen Hälften ein und desselben Dialysats bzw. mit je einer gleichen Hälfte von zwei gleichwertigen Dialysaten angestellt. Gleichsinnigen Ausfall beider Reaktionen wird man bei gegebener Hülsendurchlässigkeit nur dann erhalten können, wenn jede einzelne der dialysablen Abbaustufen, die aus je einem Eiweißmolekül gebildet wurde, die gleiche Empfindlichkeit gegenüber beiden Reaktionen besitzt. Das wäre der Fall, wenn äquimolekulare Lösungen der einzelnen Abbaustufen die gleiche Schwellenwertskonzentration für die Biuretreaktion und die Ninhydrinprobe besäßen. Nachdem nun aber ein Teil der nach Abderhaldens Lehre sich bildenden Abbaustufen zwar mit Ninhydrin reagiert, aber keine Biuretreaktion gibt, und gerade diese zu den Krystalloiden gehören,

so ist diese Möglichkeit von vornherein ausgeschlossen. Denn soll unter diesen Umständen das Ergebnis beider Reaktionen gleichsinnig ausfallen — und nur unter dieser Voraussetzung war ja der Ersatz der Biuretreaktion durch die Ninhydrinprobe erlaubt —, so muß der Abbau oberhalb der abiureten Stufe aufhören, oder aber es muß die Biuretreaktion durch größere Empfindlichkeit den Vorsprung einholen, den die Ninhydrinprobe infolge der größeren Zahl reaktionsfähiger α-Aminocarboxylgruppen vor ihr voraus hat.

In der Literatur über die spezifischen Abwehrfermente begegnet man nun mehrfach der Angabe, daß die Ninhydrinprobe empfindlicher sei als die Biuretreaktion. Wenn jedoch, wie Abderhalden annimmt, die α-Aminocarboxylgruppe alleiniger Träger der Reaktion ist, so muß, da ja auch jeder Eiweißkörper die Reaktion ebenfalls aufweist, jedes Eiweißmolekül mindestens auch eine freie α-Aminocarboxylgruppe enthalten, also mindestens die gleiche Zahl, die ein Molekül der Monoaminosäuren maximal enthalten kann. Äquimolekulare Lösungen beider müßten daher gleich starke Ninhydrinproben geben, äquimolekulare Lösungen von Diaminosäuren die doppelte Farbentiefe wie die entsprechende Monoaminosäurelösung aufweisen.

Da indessen das Molekulargewicht keines einzigen Eiweißkörpers mit Sicherheit bekannt ist, so lassen sich derartige Lösungen gar nicht bereiten, sondern nur gewichtsprozentisch vergleichbare. Da ferner Aminosäuren überhaupt keine Biuretreaktion geben, so hat ein Vergleich der Empfindlichkeit beider Reaktionen gar keinen Sinn, wenn man nicht die Qualität sämtlicher Abbaustufen in der betreffenden Lösung kennt und zugleich die Konzentration jedes einzelnen dieser qualitativ verschiedenen Körper berücksichtigt. Das ist indessen unmöglich. Die Vorstellung von der verschiedenen Empfindlichkeit der beiden Reaktionen geht zweifellos darauf zurück, daß ein bestimmtes Volumen einer Lösung von bestimmtem Eiweißgehalt eine positive Biuretreaktion und relativ schwache Ninhydrinprobe aufweist, daß hingegen dieses Verhältnis sich umkehrt in dem Maße, wie die hydrolytische Aufspaltung der gleichen Eiweißlösung die Zahl der niedrigsten, reaktionsfähigen Abbauprodukte vermehrt.

Der erste Versuch, die aus Abderhaldens Lehre sich er-

gebenden Schlußfolgerungen mit den Forderungen in Einklang zu bringen, die das Dialysierverfahren bei folgerichtigem Aufbau erfüllen sollte, führt zu inneren Widersprüchen und zeigt, daß das Verfahren auf hypothetischer Grundlage beruht.

Das wird noch deutlicher aus Abderhaldens eigenen Angaben[1]):

„Es ist wohl möglich, daß z. B. in einem Falle eine Menge hochmolekularer Peptone im Dialysat vorhanden ist. Die Biuretreaktion ist auffallend stark, dagegen die Ninhydrinreaktion schwach. Umgekehrt ist der extreme Fall denkbar, daß der Abbau die Peptongrenze unterbietet. Man erhält eine tiefblaue Ninhydrinreaktion als Zeichen dafür, daß viele Verbindungen mit der Struktur der Aminosäuren vorhanden sind, während die Biuretreaktion negativ ausfällt. Diese Bemerkungen zeigen schon, daß das Ninhydrin viel mehr Verbindungen der Reihe der Eiweißabbaustufen erkennen läßt als die Biuretreaktion."

Es bedarf daher der Aufklärung, wie es möglich ist, daß Abderhalden trotzdem mit beiden Reaktionen gleiche Resultate erzielen konnte. Sie ergibt sich aus der Ursache, die Abderhalden veranlaßte, die Biuretreaktion, wenn auch nicht theoretisch, so doch praktisch zu verlassen und die Ninhydrinprobe an ihre Stelle zu setzen.

Der Grund dafür liegt in der Unsicherheit ihrer Deutung, als deren Ursache Abderhalden die individuell verschiedene Empfindlichkeit des menschlichen Auges für den Farbenton der Biuretreaktion verantwortlich macht. Sie wird in mehreren Farbentönen beobachtet, nämlich als rote und violette Reaktion, sowie in Übergangstönen zwischen beiden. Sie unterscheidet sich demnach nur wenig von der Ninhydrinprobe, die zwar in allen Übergangstönen zwischen Blau und Rot vorkommt, von Abderhalden jedoch als positiv nur dann angesehen wird, wenn sie blau bis violett erscheint. Der Farbenton beider Reaktionen ist demnach voneinander so wenig verschieden, daß hierin unmöglich der Grund für die unsichere Deutung der Biuretreaktion liegen kann.

Die physiologische Optik lehrt aber außerdem, daß das normale menschliche Auge für den roten Teil des sichtbaren

---

[1]) Abwehrfermente, 4. Aufl., S. 290.

Spektrums empfindlicher ist als für den blauen. Darauf beruht bekanntlich die Bevorzugung roter Signallichter. Man sollte daher eigentlich erwarten, daß dann wenigstens die Ninhydrinprobe häufiger negativ ausfiele als die Biuretreaktion. Abderhaldens Erklärung ist zweifellos unrichtig. Der eigentliche Grund ergibt sich aus folgendem Versuch: In 20 von Schöps in Halle geeichten und von mir nachgeprüften und einwandfrei befundenen Hülsen wurde mit 1 $^{0}/_{0}$iger Seidenpeptonlösung „Höchst“ II — bei 37° ein Dialysierversuch von 24 stündiger Dauer gegen 20 ccm Wasser angesetzt und die Dialysate vereinigt. Durch Probieren wurde alsdann in dem Sammeldialysat diejenige Menge bestimmt, die auf 10 ccm verdünnt, eben eine negative Biuretreaktion nach Abderhaldens Vorschrift ergab. Mit der gleichen Menge wurden 19 Reagensgläser beschickt und die Probe in gleicher Weise angesetzt. Nunmehr fanden sich 4 Dialysate, die eine positive Biuretreaktion aufwiesen. Die 20 Proben wurden deshalb drei weiteren Beobachtern mit der Aufforderung vorgelegt, etwa vorhandene, positive Reaktionen zu bezeichnen. Ohne Kenntnis des Zwecks dieser Versuche und des von dem Verfasser gefundenen Resultats und unabhängig voneinander gab jeder sein Urteil ab. Das Ergebnis war, daß schließlich jeder Beobachter 3 bis 4 positive Reaktionen herausfand, jedoch war jede dieser Serien aus verschiedenen Proben zusammengestellt. Das Resultat änderte sich aber sofort, als nunmehr die Reaktionszone vor einem Spalt beobachtet wurde, der durch Bekleben einer Mattscheibe mit schwarzem Papier in der Breite von wenigen Millimetern keilförmig ausgespart war[1]).

Es herrschte nunmehr kein Zweifel über den negativen Ausfall sämtlicher Reaktionen. Noch schärfer fiel aber der Versuch aus, wenn man dann in folgender, auch bei den Abbauversuchen durchgeführten Weise verfuhr. Die nach Abderhalden angesetzte und abgelesene Probe wird ordentlich durchmischt (Finger mit Gummikappe!) und durch ein gehärtetes

---

[1]) Die Beobachtung der Reaktion vor einer Mattscheibe wird auch von Abderhalden, aber erst in der 4. Auflage der Abwehrfermente empfohlen. Sie hat demnach in den viel früher angestellten Versuchen, die die Einführung der Ninhydrinprobe an Stelle der Biuretreaktion veranlaßten, noch nicht Anwendung finden können.

Filter (Schleicher & Schüll Nr. 575) gegeben. Der positive Ausfall der Reaktion ist an einer rötlich-violetten, in stärkerer Verdünnung fast rosarot erscheinenden Verfärbung der Lösung zu erkennen. Man wird häufig beobachten, daß die trotz Filtrierens noch etwas getrübte Lösung nach längerem Stehen ein matt bläulich-weißes Sediment absetzt. Verwechslungen mit der positiven Biuretprobe sind vollständig ausgeschlossen, wenn man Flüssigkeit und Sediment trennt oder eine Kontrolle mit Wasser zum Vergleich anstellt. Beobachtet man die Flüssigkeitssäule auf weißem Grund in ganzer Schichthöhe, so nimmt die Empfindlichkeit der Probe entsprechend der gegenüber Abderhaldens Anordnung dickeren Flüssigkeitsschicht um das 2- bis 3fache zu. Verdünnt man die schwächste, eben noch als rosarot erkennbare Probe weiter, so nimmt sie eine unbestimmbare, orangerote bis gelbe Färbung an. Als positive Reaktionen wurden nur diejenigen gerechnet, die die rosarote bis rotviolette Farbe mit Sicherheit noch erkennen ließen. Auf diese Weise ist man sogar imstande, allerdings nur innerhalb sehr enger Grenzen, eine relative, quantitative Bestimmung der biureten Substanz auszuführen. Der bisher in der Deutung positiver und negativer Reaktionen herrschende Zweifel ist damit nahezu vollständig beseitigt, die Grenze des Anwendungsbereiches gegenüber der von Abderhalden geübten Ausführung der Probe um das 2- bis 3fache erweitert und vor allem der Beweis erbracht, daß nicht die innerhalb enger Grenzen schwankende, individuelle Empfindlichkeit für den Farbenton der Reaktion, sondern ihre nicht empfehlenswerte Ausführung als Schichtprobe die Ursache ihrer bisher unsicheren Deutung bildet. Die Unsicherheit der Abderhaldenschen Methodik beginnt demnach nicht erst mit der Einführung der Ninhydrinprobe, sondern bereits mit der Einführung des Dialysierverfahrens überhaupt.

Diese Unsicherheit der Deutung trifft natürlich die Versuche Abderhaldens in gleicher Weise wie diejenigen anderer Autoren, die mit der Biuretreaktion arbeiteten.

Diese experimentell festgestellten Tatsachen klären nun zwar die Deutung der einzelnen Versuche auf, jedoch lassen sie einen anderen Punkt offen. Wenn Abderhalden, worüber ja seine angeführten Worte keinen Zweifel lassen, den negativen Ausfall der Biuretreaktion auf eine ungenügende Konzen-

tration biureter Stoffe zurückführt, so wäre es ganz unnötig gewesen, die Reaktion zu verlassen. Eine zum Nachweis genügende Konzentration mußte sich dann ja leicht durch Einengen eines oder mehrerer Dialysate oder auch durch Anwendung größerer Mengen Serum (Ferment) und Substrat im Einzelversuch auf Grund der S. 6ff. dargelegten Tatsachen jederzeit erreichen lassen. In diesem Falle war dann aber die Anwendung der Ninhydrinprobe natürlich nicht möglich, weil bei Anwendung größerer Serummengen die Konzentration der mit Ninhydrin reagierenden, aus dem Serum stammenden Stoffe im Dialysat sehr bald eine solche Höhe erreichen muß (S. 7), daß geringste Grade des Abbaus sich der Feststellung entziehen.

Die andere Annahme hingegen, daß die Biuretreaktion negativ ausfällt, weil die Peptongrenze unterschritten wird und infolgedessen im Dialysat nur abiurete Stoffe auftreten, beruht einfach auf einer unrichtigen Überlegung. Dieser Fall kann nur dann eintreten, wenn eine unzureichende Substratmenge zum Versuch gewählt wurde. Da die notwendige Substratmenge aber bei der Eichung der Organe festgestellt wird, kann dieser Fall nicht eintreten, es sei denn, daß ein besonders wirksames Ferment, in dem betreffenden Falle das Substrat, vorzeitig erschöpfte. Die Größe der Drehungsänderung im optischen Versuch, die Abderhalden als Maß des Umsatzes ja betrachtet, würde, falls diese Annahme Abderhaldens zutrifft, durch Vergleich mit dem ersten Versuch dies klarstellen. Da schließlich die Schwangerschaftsreaktion zuerst an Placentapepton gefunden, dann später auf die Placenta selbst übertragen und anfangs ausschließlich mit der Biuretreaktion nachgewiesen wurde, so ist gerade für diesen wichtigsten Fall die Möglichkeit vollständig ausgeschlossen, daß bei zweckentsprechender Versuchsanordnung eine negative Biuretreaktion neben positiver Ninhydrinreaktion vorkommt.

Wird sie bei zweckentsprechender Versuchsanordnung trotzdem beobachtet, so ergeben sich folgende Möglichkeiten:

1. Es liegen überhaupt keine Polypeptide vor. „Durch das Dialysierverfahren kann man die kolloidalen Stoffe ausscheiden und ferner mit der Biuretreaktion auch die Peptone feststellen, oder aber bei negativem Ausfall der Probe be-

weisen, daß einfachere Verbindungen als Peptone vorliegen müssen[1]."

2. Abderhalden hat sich durch die unbrauchbare Biuretschichtprobe täuschen lassen. In diesem Falle fehlt seiner Lehre hinsichtlich der Charakterisierung der Abbauprodukte die sichere experimentelle Grundlage, soweit hierfür das Dialysierverfahren in Frage kommt. Die Entscheidung trifft die optische Methode. Denn Ninhydrinprobe und optische Methode müssen nicht nur gleichsinnig, sondern zugleich auch so ausfallen, wie es die Abderhaldensche Lehre verlangt. Deshalb würde

3. Negative Biuretreaktion und positiver Ausfall der Ninhydrinprobe bei gleichzeitigem Eintritt einer Drehungsänderung, wenn sie entgegengesetzt der Abderhaldenschen Lehre beobachtet würden, nur den Schluß zulassen, daß Abderhaldens Lehre in theoretischer und methodischer Hinsicht gleichzeitig verfehlt ist. Anstatt nun für die qualitative Biuretreaktion in der einfachen, geschilderten Weise geeignete Nachweisbedingungen zu schaffen, hat Abderhalden sie verlassen und an ihre Stelle die Ninhydrinprobe gesetzt. Dabei hat er jedoch vollständig übersehen, daß diese, nur als relative oder absolute, quantitative Bestimmungsmethode verwertbare Reaktion, ganz andere Versuchsbedingungen fordert. Sollen beide Reaktionen, wie Abderhalden ja behauptet, bei der von ihm vorgeschriebenen Art der Ausführung sich gleichwertig vertreten können, so mußte das Dialysierverfahren in folgender Weise ergänzt werden. Es war ein absolutes Maß der Ninhydrinreaktion und der Hülsendurchlässigkeit zwecks Beschaffung einer „Normalhülse" einzuführen. Als Maßeinheit der Ninhydrinreaktion war ihr Schwellenwert, ausgedrückt in α-Aminocarboxyleinheiten, zugrunde zu legen. Dieser ist durch das Glykokoll gegeben, weil dieser Körper niedrigstes Molekulargewicht mit kleinstem Molekularvolumen und größter Konzentration an α-Aminocarboxylgruppen in seinem Molekül vereinigt, zu den Krystalloiden zählt und ein Endglied fermentativen Eiweißabbaus darstellt. Da eine Bestimmung der oberen Grenze der Hülsendurchlässigkeit mit Polypeptiden von bekannter Kettenlänge praktisch

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 85, 147.

undurchführbar ist, war ein „Normalseidenpepton“ herzustellen, das folgende Bedingungen erfüllen muß. Eine Lösung desselben von bekanntem Gehalt (nach Abderhalden 1 $^0/_0$ ig, besser in bezug auf N „normal“) muß bei konstantem N-Gehalt ein festes Verhältnis der Schwellenwertskonzentrationen der positiven Ninhydrinprobe, gemessen in Glykokoll- (= α-Aminocarboxyl-)Einheiten, und der positiven Biuretreaktion aufweisen. Als gleichwertig in bezug auf ihre Durchlässigkeit sind dann diejenigen Hülsen anzusehen, die, unter gleichen Bedingungen (Zeit, Temperatur!) geprüft, ein Dialysat geben, das bei gleichem, absoluten N-Gehalt Konstanz der Schwellenwertskonzentrationen beider Reaktionen gleichzeitig aufweist. Den höchsten, erreichbaren Grad absoluter und dabei gleichwertiger Durchlässigkeit werden dann diejenigen Hülsen besitzen, die alle im Seidenpepton vereinigten Stoffe hindurchtreten lassen. Ihr Dialysat müßte den größten absoluten N-Gehalt aufweisen, gleichzeitig die Schwellenwertskonzentrationen untereinander und zum N-Gehalt in dem gleichen Verhältnis stehen, wie in der Normalseidenpeptonlösung. Es erübrigt sich, den Gedanken fortzuführen, wenn man demgegenüber Abderhaldens Ausführungen[1]) liest:

„Vielfach ist der Wunsch geäußert worden, es möchte speziell für den Ausfall der Ninhydrinreaktion eine Farbenskala angegeben werden, damit die Stärke der Reaktion allgemein gleichartig angegeben werden könne. Er läßt sich nicht gut erfüllen, weil die Ninhydrinreaktion sich nicht scharf abstufen läßt. Jeder einzelne Untersucher wird bei einiger Erfahrung bald beurteilen können, ob die Reaktion stark, mittelstark, schwach oder sehr schwach ausgefallen ist. ... Man darf der Intensität der Reaktion kein zu großes Gewicht beilegen.“ (Folgt Zitat S. 9.) Demgegenüber sei auf die Untersuchungen von Abderhalden und Lampé[2]) verwiesen, die mit Glykokollreaktionen die Empfindlichkeit der Ninhydrinprobe gemessen haben und zu folgendem Schluß kommen: „Man wird ohne Zweifel diese Methode zu einer colorimetrischen Bestimmung ausarbeiten können.“ Vgl. ferner Abderhalden und Schmidt[3])

[1]) Abwehrfermente, 4. Aufl., S. 289.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 81, 473.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 85, 143.

Die Hülsen hält Abderhalden für unzuverlässig, der Nachprüfung bedürftig und sieht in ihnen eine Hauptfehlerquelle des Dialysierversuchs. Eine Nachprüfung der Abderhaldenschen Versuche ist denn auch nur dadurch möglich gemacht worden, daß ein Seidenpepton von gegebener Beschaffenheit im Handel käuflich zu haben ist. Man sollte daher erwarten, daß die Eigenschaften dieser Substanz in sorgfältigster Weise chemisch und physikalisch bestimmt wären. Ein Blick auf die Tabelle I zeigt, daß diese von Abderhalden empfohlenen Präparate eine völlig verschiedene Beschaffenheit aufweisen, nach Abderhaldens eigener Angabe sich in gleichartiger Beschaffenheit auch gar nicht darstellen lassen und, wie sich später zeigen wird, auch ein ganz anderes Drehungsvermögen, demnach also auch eine andere Zusammensetzung als die aus Organen bereiteten Peptone besitzen. Die Methode der Hülsenprüfung ist von Haus aus verfehlt, weil die Hülsen, welche den verschiedenen Forschern zu Gebote stehen, jeden beliebigen Grad von Durchlässigkeit besitzen können. Man ist einfach auf die Hülsen von Schöps angewiesen, deren Durchlässigkeit wiederum von dem jeweilig zur Prüfung benutzten Pepton abhängt, über dessen Gehalt an Aminosäuren und Polypeptiden hinsichtlich ihrer Art und Menge sich nichts im Einzelfalle aussagen läßt. Erreichbar ist bestenfalls gleiche Durchlässigkeit der Hülsen für den einzelnen Forscher.

Tabelle I.

	3% Rohr 100 mm	2% Rohr 100 mm	1% Rohr 200 mm	Bemerkungen
Seidenpepton „Höchst“ I		— 0,32°	— 0,32°	
„ „ II	— 0,93°	— 0,63°	— 0,63°	
„ „Halle“ .	— 0,30°	— 0,20°	— 0,20°	enthält Spuren H_2SO_4
(„ „Oppler“)	— 0,73°	— 0,51°	— 0,50°	enthält eine beabsichtigte kleine Menge Na_2SO_4

Als Vertreter der proteo-peptolytischen Fermente sind die spezifischen Abwehrfermente den Gesetzen unterworfen, die für Ferment-(Enzym-)Reaktionen allgemein gültig sind: die Geschwindigkeit der Enzymwirkung und der Endzustand des

enzymatischen Prozesses sind von der Enzymmenge und der Konzentration des Substrats abhängig. Im großen und ganzen ändert sich die Geschwindigkeit proportional der Enzym- und Substratmenge.

Damit stehen einige Beobachtungen im Einklang, die an den Abwehrfermenten Abderhaldens gemacht wurden.

Oeller und Stephan[1]) fanden, daß unter sonst gleichen Bedingungen ein zweifellos aktives Serum versagte, wenn seine Menge auf etwa 0,5 ccm vermindert wurde.

Flatow[2]), und ohne Kenntnis der Flatowschen Versuche stellten auch Verfasser fest, daß die Intensität der Ninhydrinprobe mit zunehmender Substratmenge ansteigt.

Nach Abderhalden ist der Ausfall des Dialysierversuchs von dem Gehalt des Organs an spezifischem Zellmaterial stark abhängig. Zum Teil, um Fehlern infolge spezifischen Substratmangels, hervorgerufen durch Inhomogenität des Substrats, zu entgehen, soll man daher die Organe zerkleinern. Bei gleichzeitiger Anwendung des Dialysierverfahrens und der optischen Methode ergaben zahlreiche Versuche Abderhaldens, daß bei einer 16- bis 20 stündigen Dialyse die Drehungsänderung im optischen Versuch nach 48 Stunden größer war als nach 24 Stunden. In vergleichenden Dialysierversuchen von verschiedener Zeitdauer lieferte Kjaergaard[3]) den Beweis, daß mit der Versuchsdauer die Menge der Abbauprodukte zunahm. Diese wenigen Beispiele beweisen zwar noch nicht, daß es sich um die Wirkung peptolytischer Fermente handelt, dagegen um so sicherer, daß die Konzentration der Abbauprodukte von der Ferment- und der Substratmenge und der Dauer ihrer gegenseitigen Einwirkung aufeinander abhängig ist, falls wir in der Erscheinung die Wirkung peptolytischer Fermente zu sehen haben. Neuerdings bestreitet Abderhalden[4]) diese Tatsachen und setzt sich damit in Widerspruch mit seinen eigenen, soeben erwähnten Angaben.

Vergleicht man nun damit die Vorschriften, die Abderhalden zur Ausführung des Dialysierversuchs gegeben hat, so

[1]) Münch. med. Wochenschr. 1914 Nr. 1 u. 2.

[2]) Münch. med. Wochenschr. 1914 S. 1169.

[3]) Zeitschr. f. Immunitätsforschung 22, H. 1, 31; cf. Anmerkung S. 1

[4]) Fermentforschung 1, 1, S. 20; cf. zweiter Teil II dieser Mitteilung

stellt sich heraus, daß es ein feststehendes Verfahren überhaupt nicht gibt, sondern, daß die Ausführungsbestimmungen im Gegenteil die genannten Beziehungen vollständig vernachlässigen, in allen wesentlichen Teilen einer fortlaufenden Veränderung unterworfen sind, trotzdem aber die somit überhaupt nicht miteinander vergleichbaren, zu verschiedenen Zeiten und mit Methoden, welche ganz verschiedene Ziele verfolgen (N-Bestimmung, van Slyke, Interferometrische Methode), gefundenen Versuchsresultate einander gleichgesetzt werden. Die Serum-(Ferment-)menge schwankt in Abderhaldens Versuchen zwischen 3 und 1 ccm[1]), die zahlenmäßig anfangs unbestimmte Substratmenge später zwischen ca. 1,0 und schließlich 0,5 bis 0,25 g[2]). Diese letztere Zahlenangabe wird praktisch jedoch gleichzeitig durch die Vorschrift aufgehoben, die Bemessung der Organmenge jeweilig den Erfordernissen des Einzelfalles anzupassen[3]). Die Dauer des Dialysierversuchs ist auf 24 Stunden, dann 16—20 Stunden bemessen[4]), neuerdings wird ihre Verlängerung auf 24 Stunden wieder empfohlen.

Die absolute Konzentration der Abbauprodukte wurde bis zur Einführung der Mikro-N-Bestimmung unberücksichtigt gelassen. Als Hülsenmaterial (Biuretreaktion) dienten ursprünglich Fischblasenkondoms[5]), über deren Durchlässigkeit und Oberflächengröße im Vergleich zu den Papierhülsen keinerlei Angaben Abderhaldens vorliegen. Die Ergebnisse wurden auf letztere einfach übertragen, trotzdem der Effekt von der absoluten Durchlässigkeit in wesentlicher Weise abhängig ist und deswegen die Forderung gleichmäßig durchlässiger Hülsen eine Hauptbedingung für die Verwertung der Versuchsergebnisse darstellt.

Hält man diese Tatsachen und Widersprüche, welche in den nachfolgenden Abschnitten dieser Mitteilung noch erheblich sich vermehren werden, zusammen, so muß in Abderhaldens Vorstellungskreis ein fundamentaler Irrtum sich eingeschlichen haben,

---

[1]) Handb. d. bioch. Arbeitsmethoden 6, 227; Abwehrfermente, 4. Aufl. S. 267.

[2]) Abwehrfermente, 4. Aufl., S. 267.

[3]) Abwehrfermente, 4. Aufl., S. 248.

[4]) Abwehrfermente, 3. u. 4. Aufl.; Zeitschr. d. physiol. Chem. 77, 255.

[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 77, 255.

der ihm selbst entgangen ist. Auf den richtigen Weg führen die auf S. 13 berührten Unterschiede zwischen Biuret- und Ninhydrinreaktion. Die Ninhydrinreaktion kann, da sie nur absolute, wenn auch zahlenmäßig nicht bestimmte, in letzter Linie aber tatsächlich von Abderhalden auf Glykokolleinheiten bezogene Differenzen angibt, nur als quantitative Methode verwertet werden und deshalb überhaupt nur anzeigen, daß die peptolysierende Fähigkeit des Schwangerenserums größer ist als diejenige des Serums Nichtschwangerer. Die Biuretreaktion hingegen ist als quantitative Reaktion nicht verwendbar.

Zwischen dem Schwellenwert der Biuretreaktion und der Farbentiefe der Ninhydrinprobe können, aber müssen nicht zahlenmäßige Beziehungen bestehen. Abderhalden hat nun gleichzeitig mehrere Fehler gemacht und nicht erkannt. Er hat sich 1. durch die Biuretschichtprobe offenbar täuschen lassen, 2. die Biuretreaktion wie eine relative, quantitative Bestimmungsmethode analog der Ninhydrinprobe benutzt und umgekehrt die Ninhydrinreaktion der Biuretreaktion analog als qualitative Reaktion angewandt, indem er 3. dabei gleichzeitig übersehen hat, daß die Ninhydrinprobe niemals negative Werte anzeigen kann. Sein Nachweis der Abbauprodukte stellt somit eine unstatthafte Mischung aus einer qualitativen und quantitativen Reaktion dar, die sich nun ebensogut als quantitative wie als qualitative Reaktion gebrauchen läßt und tatsächlich auch so gebraucht wird. Ein Abbau gilt nämlich als nicht vorhanden, wenn die zur Erzielung des Schwellenwerts der positiven Ninhydrinreaktion notwendige Konzentration der α-Aminocarboxylgruppen nicht erreicht wird. In diesem Falle benutzt man die Reaktion bei einer aus den Elementen für eine qualitative und quantitative Methode gemischten Versuchsanordnung als qualitative Reaktion. Der Versuch ist aber negativ auch dann, wenn bei gleicher Versuchsanordnung das Dialysat des Versuchs Serum allein bereits mit Ninhydrin positiv reagiert, dasjenige des Versuchs Serum + Organ aber eine zwar ebenfalls positive Reaktion liefert, deren Farbentiefe jedoch derjenigen gleich ist, die das Dialysat des Versuchs Serum allein ergibt. In diesem Falle dient die Reaktion als relative, quantitative Methode. Eine derartige Methode ist ein Unding. Sie konnte sich niemals ergeben, wenn sie folgerichtig aus ex-

perimentell festgestellten Tatsachen entwickelt wurde. Als letzte Ursache dieses Mißgriffs bleibt daher mit zwingender Notwendigkeit nur die Annahme übrig, daß Abderhalden die Hypothese von der Spezifizität der Abwehrfermente als bewiesene Tatsache a priori vorausgesetzt und deshalb bereits bei Einführung des Dialysierverfahrens sich mit Versuchen zufrieden gegeben hat, die an sich, wie ein Vergleich mit seinen heutigen Anforderungen an die Methodik zeigen, ihm nicht genügt hätten, wenn er von der Beobachtung zur Theorie, statt deduktiv von der Theorie zu den Tatsachen gekommen wäre.

Daß diese Deutung die richtige ist, unterliegt wohl kaum einem Zweifel[1]): „Die ganze Methodik hat gewiß eine Schwäche — wir sind zurzeit nicht so weit, daß wir auf chemischem oder physikalischem Wege feststellen können, ob ein bestimmtes Substrat spezifisch ist.“ Damit ist gesagt, daß der von anderen durchaus bestrittene, praktische Erfolg, der biologische Versuch, das einzige Beweismittel darstellt.

Wir sind zum Ausgangspunkt unserer Untersuchung, den „scheinbar“ nicht spezifischen Reaktionen, damit zurückgekehrt und haben gefunden, daß Abderhaldens Beweisführung sich im Kreise bewegt, indem dieselbe Hypothese zuerst als Voraussetzung und gleichzeitig als Ziel des Beweises dient. Es möge deshalb als Abschluß dieser kritischen Betrachtung noch ein Beispiel Platz finden, das in überzeugender Weise die Richtigkeit der aufgestellten Behauptung beweist.

Der Grund, warum man die Spezifizität der Substrate bisher nicht nachweisen kann, liegt nicht in dem Mangel geeigneter chemischer Nachweisreaktionen, diese sind doch in der Biuret- und Ninhydrinreaktion usw. gegeben, sondern in der Unmöglichkeit, die spezifischen Substrate von den nicht spezifischen Anteilen des gleichen Organs zu trennen: „Anzustreben ist die Darstellung von „reinen“ Zellen einer Art als Ausgangsmaterial“[2]). Es ist daher von großem Interesse, daß man dieses Ideal allerdings erreichen und gerade für den Fall experimentell verwirklichen kann, der die Spezifizität des Schwangerschaftsferments und die Spezifizität derjenigen „schein-

[1]) Münch. med. Wochenschr. **1914**, 1899.
[2]) Abwehrfermente, 4. Aufl., S. 235.

bar“ nicht spezifischen Reaktion, welche die hauptsächlichste Fehlerquelle im Dialysierversuch nach Abderhalden darstellt, mit einem Schlage gleichzeitig beweisen würde. Dieser Fall ist gegeben, wenn man zwischen dem spezifischen Schwangerschaftsferment und dem gegen Bestandteile der roten Blutkörperchen eingestellten, spezifischen Abwehrferment zu unterscheiden hat, wenn also z. B. eine einwandsfrei bereitete Placenta mit Ninhydrin einen Abbau ergibt unter der Einwirkung von

1. Serum I einer gesunden Schwangeren,
2. Serum II eines im übrigen gesunden, männlichen Hämatomträgers,
3. Serum III einer Nichtgeschwängerten oder eines Mannes.

Die Reindarstellung der spezifischen Placentarbestandteile ist in diesem Falle unnötig, da Männerblut ein auf jene eingestelltes, spezifisches Ferment niemals enthalten kann. Die roten Blutkörperchen hingegen lassen sich in „reinem“ Zustande isolieren, und zwar nach einem Verfahren, welches Abderhalden[1]) selbst in Gemeinschaft mit Deetjen ausgearbeitet hat! Läßt man nun das gleiche Volumen Serum III auf gleiche Gewichtsmengen der Placenta und koagulierter „reiner“ Erythrocyten einwirken, so muß, da in letzterem Falle die Konzentration des Substrats unter allen Umständen unendliche Male größer ist, die Ninhydrinreaktion des Dialysats der Blutkörperchen eine intensivere Ninhydrinreaktion aufweisen. Diesen direkten, experimentellen Beweis hat Abderhalden nicht geführt, sondern, wie das Zitat S. 2 beweist, durch Analogieschluß die Anwesenheit des Abwehrferments gegen rote Blutkörperchen auf Grund der Hypothese gefolgert; er hat ihn damals auch gar nicht führen können, weil die Gedankenfolge, die zu diesem Versuch hingeleitet hat, die Erkenntnis voraussetzt, daß die Lehre von den spezifischen Abwehrfermenten, soweit sie aus Dialysierversuchen erschlossen wurde, das Ergebnis einer Versuchsanordnung darstellt, die bei ihrer Entstehung das Beweisziel als a priori bewiesene Tatsache bereits voraussetzte.

Faßt man demgegenüber zusammen, was an sicherem, experimentellen Tatsachenmaterial die Arbeit über die Abder-

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 53, 280

haldenschen Abwehrfermente zutage gefördert hat, so läßt sich feststellen: Wenn man Serum auf gekochte Organe einwirken läßt, so geht in das Dialysat eine N-haltige Substanz über, die mit Ninhydrin eine gefärbte Verbindung bildet. Alles, was darüber hinausgeht, ist unerwiesen.

Bei diesem Stande der Dinge war es von höchstem Interesse, experimentell zu untersuchen, was es eigentlich mit der Lehre von den Abwehrfermenten für eine Bewandtnis habe. Daß zu diesem Zweck optische Methode und Dialysierverfahren beizubehalten waren, kann keinem Zweifel unterliegen. Ebenso klar ist aber auch, daß das Dialysierverfahren geändert werden mußte. Es standen mehrere Wege offen. Man konnte die Biuretreaktion in der auf S. 224 geschilderten Weise ändern. In diesem Falle war es nicht möglich, die Ninhydrinprobe in demselben Dialysat anzustellen. Es kam ferner ein Ausbau der Ninhydrinprobe zu einer absoluten, quantitativen Methode in Frage. Dieser Versuch stellte sich von vornherein als aussichtslos heraus aus Gründen, die in dem Abschnitt Hülseneichung erörtert werden. Es blieb deshalb nur der in den später mitgeteilten Abbauversuchen auch tatsächlich beschrittene Weg übrig, das Verfahren im wesentlichen beizubehalten, gleichzeitig aber so abzuändern, daß das Verfahren innerhalb der von Abderhalden gebilligten, wenn auch dehnbaren Grenzen den Bedingungen genügte, die auf Grund der S. 227 gezogenen Schlußfolgerungen zur Fällung einer sicheren Entscheidung gegeben sein mußten.

Nachdem im Laufe der Zeit jeder einzelne Teil der Methodik für die Mißerfolge verantwortlich gemacht worden ist, hat Abderhalden sich schließlich dahin entschieden, daß die mangelhafte Beschaffenheit der Organsubstrate die Hauptfehlerquelle des Verfahrens darstelle. Es war daher unerläßlich, zu diesen Versuchen ein Organmaterial zu beschaffen, das auch von Abderhalden als einwandsfrei anerkannt wird. Durch das liebenswürdige Entgegenkommen der Herren Prof. Abderhalden und Dr. Lampé bin ich wenigstens hinsichtlich der wichtigsten Organe — Placenta und Carcinom — in die angenehme Lage versetzt, diese Bedingung erfüllen zu können. Beiden Herren spreche ich dafür auch an dieser Stelle meinen wärmsten Dank aus und fühle mich verpflichtet, noch ganz

besonders hervorzuheben, daß Abderhalden sein Bestreben, eine Klärung herbeizuführen, durch Überlassung von Proben einer in seinem Institut hergestellten Placenta in objektiver Weise auch dann noch betätigte, nachdem ich ihn zuvor von dem Ergebnis meiner Untersuchung summarisch in Kenntnis gesetzt hatte. Dagegen hat Abderhalden meinen mehrfach geäußerten, dringenden Wunsch um zeitweilige Überlassung einer Probehülse zwecks Herstellung von Hülsen gleicher Durchlässigkeit zu erfüllen, sich leider nicht entschließen können.

In dem nachfolgenden Abschnitt über Methodik des Dialysierverfahrens wird sich Gelegenheit bieten, die Ausführungen des vorangegangenen Teils zu vervollständigen und Verschiedenes nachzutragen, was im Interesse einer klaren Darstellung bisher unerörtert blieb. Eine kritische Würdigung der späteren Abbauversuche macht ein genaues Studium auch der nachfolgenden Abschnitte notwendig.

B. Spezielle Methodik des Dialysierversuchs.

Die Versuchsanordnung war im Prinzip so zu treffen, daß sämtliche Versuche miteinander zunächst überhaupt vergleichbar werden. Das erfordert:

1. Gleiche Menge Serum und Organ für sämtliche Versuche.

2. Vermehrung der dialysierbaren Abbauprodukte gegenüber der Versuchsanordnung Abderhaldens.

3. Ein Meßverfahren zur Bestimmung der Farbentiefe der Ninhydrinreaktion.

4. Eiweißdichte Hülsen, die einen höheren Grad von Durchlässigkeit besitzen, als die nach Abderhaldens Vorschrift von Schöps in Halle geeichten.

5. Prüfung der Placenta durch Serum Schwangerer und Nichtschwangerer sowie gleichzeitige Einstellung von Kontrollorganen. Erst nach dem Ergebnis dieser durch die optische Methode kontrollierten Versuche ist der weitere Gang der Untersuchung zu gestalten.

1. Die Biuretreaktion cf. S. 220.

2. Die Ninhydrinreaktion. Man versetze 6 Proben von je 10 ccm eines Sammeldialysats einer 1%igen Seidenpeptonlösung mit 0,2 ccm einer 1%igen Ninhydrinlösung. Probe I koche man nach Abderhaldens Vorschrift 1 Minute und lasse

$^1/_2$ Stunde an der Luft erkalten. Probe II hingegen koche man 3 Minuten und ersetze nach $^1/_2$ stündiger Luftkühlung den kaum merklichen Flüssigkeitsverlust. Sie bleibt auch dann dunkler als Probe I. Der Unterschied der Färbung verschwindet erst, wenn der Wasserzusatz den durch Verdampfung hervorgerufenen Flüssigkeitsverlust um ein Mehrfaches übertrifft. Erhitzt man die Proben III und IV wiederum 1 Minute, aber nicht in der Flamme, sondern in einem Kochbade, und zwar Probe III bei 100° und Probe IV bei ca. 120°, so ist Probe IV auch nach Ausgleich des Volumens dunkler als Probe III, deren Farbentiefe diejenige von Probe I nicht erreicht. Um die Färbung von Probe III derjenigen von Probe I gleich zu machen, muß die Erwärmungsdauer von Probe III erheblich verlängert werden. Erhitzt man schließlich die Proben V und VI gleichartig und gleich lange nach einer dieser Methoden, läßt Probe V $^1/_2$ Stunde erkalten, während Probe VI durch Eintauchen in kaltes Wasser schnell abgekühlt wird, so ist Probe V dunkler gefärbt als Probe VI. Alle diese Versuche, die in beliebiger Weise und mit im voraus zu berechnendem Erfolge sich variieren lassen, beweisen, daß die nach Abderhaldens Vorschrift ausgeführte Ninhydrinprobe eine unvollständige, an einem beliebigen Punkte ihres Verlaufs abgebrochene Reaktion darstellt. Die Endfärbung hängt demnach bei feststehender Ninhydrinmenge nicht nur von der absoluten Konzentration der mit Ninhydrin reagierenden Substanz (Abderhalden) und dem Konzentrationsverhältnis dieser zum Ninhydrin (Deetjen) ab, sondern als weitere Faktoren treten die absolute Höhe und Dauer der Reaktionstemperatur hinzu, sowie, was Abderhalden bereits festgestellt hat, die absolute Menge Ninhydrin. Welchen Erhitzungsmodus man wählt, dürfte an sich ziemlich gleichgültig sein, vorausgesetzt, daß nur das einmal angenommene Verfahren für sämtliche Versuchsproben streng durchgeführt wird. In praxi bewährt sich indessen die Erhitzung in Kochbädern weniger als das Kochen über freier Flamme. Diese Angabe Abderhaldens kann ich auf Grund einer ausgedehnten Erfahrung bestätigen. Es wurde daher dieser Erhitzungsmodus beibehalten, jedoch mit der Abweichung, daß in sämtlichen Versuchen dieser Mitteilung eine Erhitzungsdauer von 70 Sekunden, die im Effekt dem Kochmodus Abderhaldens

ziemlich genau entspricht, streng eingehalten wurde. An Stelle der nicht empfehlenswerten Siedestäbe wurden 3 möglichst gleichgroße Siedesteine benutzt, die aus unglasierten, gebrannten Tontellern in bekannter Weise hergestellt wurden und ein Gesamtgewicht von etwa 0,15 g hatten. Gekocht wurde nach Deetjens Vorschlag in Jenenser Gläsern, deren Maße jedoch 15/160 mm betrugen. Die Kochdauer von 70 Sekunden wurde gewählt, weil, gleichgültig, welches gegen den Siedeverzug wirksame Mittel man auch wählt, der Siedebeginn nicht absolut sicher festzustellen ist und Differenzen der Kochzeit von etwa 3 bis 5 Sekunden, wie eigens angestellte Versuche zeigten, schon Unterschiede der Farbentiefe bedingen können.

Kocht man hingegen ohne Stäbe oder Steine, so ergeben die mit dem Siedeverzug verknüpften Temperaturschwankungen unbrauchbare Resultate. Die Verwendung der vom Verfasser bevorzugten, engeren Reagensgläser erschwert zwar das Kochen ein wenig. Der Nachteil wird aber dadurch wettgemacht, daß infolge der höheren Flüssigkeitssäule Reaktionen noch als positiv erkannt werden, die in den weiten Reagensgläsern bereits negativ erscheinen. Beim Kochen muß der Flüssigkeitsspiegel der wallenden Flüssigkeit möglichst stets bis zu derselben Höhe getrieben und bis zum Schluß gehalten werden. Es empfiehlt sich daher, eine Marke an den Gläsern anzubringen. Die Gläser werden so gewählt, daß die Flüssigkeitssäule von 10 ccm eine Höhendifferenz von 1 bis 2 mm nicht überschreitet. Viele hundert Gläser wurden zu diesem Zweck ausgemessen; nur etwa 15 % derselben erwiesen sich als brauchbar. An schwächsten Ninhydrinproben kann man öfters beobachten, daß sie nach $^1/_2$ Stunde Luftkühlung aus nicht sicher erkannter Ursache bis zur Unkenntlichkeit wieder verblaßt sind. Es war daher zu überlegen, ob man nicht durch sofortige Kühlung bei verlängerter Kochzeit diesen Fehler beseitigen sollte. Da dieser Fehler indessen für alle Untersucher in gleicher Weise gilt, wurde, um das Verfahren der Vorschrift Abderhaldens möglichst anzupassen, die Luftkühlung von $^1/_2$ Stunde für die Abbauversuche streng beibehalten. Bei den anderen Versuchen sind Art und Dauer der Kühlung jedesmal genau angegeben. Die Ninhydrinmenge betrug immer 0,2 ccm der 1 %igen Lösung. Das beschriebene Kochverfahren bedeutet

eine nicht ganz unbeabsichtigte Erschwerung des Verfahrens. Man ist gezwungen, die Methode sorgfältig einzuüben und gewinnt nur auf diese Weise das Maß von Sicherheit in der Handhabung der heiklen Probe, das man besitzen muß, um sichere Schlüsse aus seinen Untersuchungen ziehen zu können.

Es sei indessen nochmals ausdrücklich darauf hingewiesen, daß auch jedes andere Verfahren zum Ziele führt, vorausgesetzt, daß die genannten Faktoren berücksichtigt und das einmal gewählte Verfahren auch dauernd eingehalten wird.

Die Bedeutung der Reaktion des Mediums für den Ausfall des Versuchs hat Abderhalden zwar als richtig anerkannt, die seiner Ansicht nach durch Gegenwart von Säuren bedingte, rote Ninhydrinprobe, sowie gelbliche und bräunliche Farbentöne als negative Reaktionen ausgeschaltet, sowie ferner die Vorschläge Deetjens der Beachtung empfohlen und zu besonders vorsichtiger Bereitung des destillierten Wassers geraten, indessen liegen systematische Untersuchungen von seiner Seite nicht darüber vor, ob und in welcher Weise hierdurch der Reaktionsverlauf beeinflußt wird. Es ist demnach ein für dessen Beurteilung erheblicher Faktor im wesentlichen von Abderhalden unberücksichtigt geblieben. Da die eigenen Versuche nur das Abderhaldensche Verfahren in Anwendung zu ziehen hatten, lag zunächst kein Anlaß vor, hierin eine Änderung eintreten zu lassen. Das Dialysierverfahren weist demnach an dieser Stelle jedenfalls eine weitere, bedenkliche Lücke auf. Vgl. zweiter Teil I.

Die quantitative Ninhydrinreaktion.

Den Schwellenwert der positiven Ninhydrinreaktion haben Abderhalden und Lampé[1]) für Glykokoll zu 1 : 11000, Abderhalden und Schmidt[2]) zu 1 : 65000 bestimmt.

Die nachfolgende auf Seite 239 befindliche Tabelle II zeigt zwei Tatsachen auf, nämlich, daß der von mir gefundene Schwellenwert mit den obigen Angaben nicht übereinstimmt, sondern etwa 1,65 : 11000 entsprechen würde. Da indessen die Art des Kochens, die absolute Temperatur, die Kochdauer usw. das Ergebnis wesentlich beeinflussen, ist auf den absoluten

[1]) l. c.
[2]) l. c.

Tabelle II

Nr.	Erhitzungsdauer 70 Sekunden		Luftkühlung 30 Minuten	Ninhydrin-reaktion	Bemerkungen
	$^n/_{1000}$-Glykokoll ccm	H_2O	Ninhydrin 1% ccm		
1	1,6	8,4	0,2	–	
2	1,7	8,3	0,2	–	
3	1,8	8,2	0,2	–	
4	1,9	8,1	0,2	?	
5	2,0	8,0	0,2	–	
6	2,1	7,9	0,2	+	
7	2,2	7,8	0,2	+	
8	2,3	7,7	0,2	+	
9	2,4	7,6	0,2	+	
10	6,0	4,0	0,2	+	+ ist natürlich viel tiefer als bei 9.
11	7,0	3,0	0,2	++	
12	8,0	2,0	0,2	+++	
13	9,0	1,0	0,2	+++	Schon so dunkel, daß die Unterscheidung verschiedener Farbentiefen unsicher wird.
14	10,0	0,0	0,2	++++	$14 > 12$

Wert kein großes Gewicht zu legen. Diese Zahlen haben nur Bedeutung für den jeweiligen Untersucher. Von Wichtigkeit ist dagegen eine andere Tatsache, nämlich, daß der Schwellenwert der positiven Reaktion nicht identisch ist mit dem kleinsten Wert, der sich überhaupt mit der Reaktion nachweisen läßt. Diese Erscheinung, die innerhalb engster Grenzen bei mehrfacher Wiederholung des Versuchs stets wieder festzustellen war, ist wohl so zu erklären, daß wie bei jeder Molekularreaktion zum Unterschied von einer Ionenreaktion auch die Bildung der gefärbten Verbindung mit Nebenreaktionen einhergeht, und daß die Bildung der Reaktionsprodukte nach Art und Menge von Bedingungen abhängt, über die nichts Sicheres auszusagen ist, weil man die chemischen Vorgänge bei der Reaktion zwischen Ninhydrin und der reaktionsfähigen N-Gruppe qualitativ und quantitativ noch nicht genau kennt. Jedenfalls ist mir aufgefallen, daß positive Reaktionen, nicht nur mit Glykokoll, sondern auch bei Abbaudialysaten eine ganz verschiedene Lebensdauer hatten. Manche behielten ihre Farbentiefe oft scheinbar viele Stunden unverändert bei, andere zeigten in kurzer Zeit bereits eine deutliche Abblassung. Namentlich konnte das an reinsten Glykokollösungen beobachtet werden.

Ist nun die gegebene Erklärung richtig oder nicht, so zeigt doch die Beobachtung jedenfalls, daß die Aussicht, auch geringste Grade positiven Abbaus nachzuweisen, dann größer ist, wenn die Serummenge so gewählt wird, daß das Dialysat des Versuchs Serum allein, gleichsam die Kosten der Nebenreaktionen bestreitet. Das ist dann der Fall, wenn eben das Dialysat des Versuchs Serum allein eine bereits positive Ninhydrinreaktion aufweist, die andererseits nur so schwach sein darf, daß geringe Zunahmen der Farbenintensität nicht verdeckt werden. Das auf S. 235 geschilderte Prinzip der Versuchsanordnung vereinigt demnach mit dem Vorzug stärkerer Konzentration der Abbauprodukte den Vorteil, auch den Reaktionsbereich nach unten weiter auszudehnen als die Versuchsanordnung Abderhaldens, der die Serummenge so gering wählt, daß das Dialysat des Versuchs Serum allein den Schwellenwert nicht erreichen soll. In Wirklichkeit wurden diese Messungen aber, wie ein Blick in die Versuchsprotokolle zeigt, in modifizierter Weise ausgeführt. An Stelle der $^{n}/_{1000}$-Glykokollösung wurde $^{n}/_{100}$-Lösung benutzt. Das war nicht nur wegen der genannten Gefahr des vorzeitigen Abblassens nötig, sondern vor allem deshalb, weil die zahlreichen Maßnahmen, die jeder einzelne Abbauversuch innerhalb einer beschränkten Arbeitszeit erforderte, zu möglichster Zeitersparnis zwang. Nach dem, was über die Faktoren gesagt wurde, die den Ausfall der Reaktion bedingen, müßte die gleiche Intensität der Farbentiefe sich auch mit einer konzentrierteren Lösung von Glykokoll erzielen lassen, wenn diese entsprechend kürzer erhitzt wurde. Das geschah dadurch, daß die Kochzeit von 70 Sekunden zwar beibehalten, dafür aber die Reaktion durch Abkühlen des Röhrchens auf die Temperatur des strömenden Leitungswassers unterbrochen wurde. Zwischen dem Ende des Kochens und Eintauchen in das Wasser liegen 3—4 Sekunden. Unter diesen Bedingungen stellen 0,6 ccm $^{n}/_{100}$-Glykokollösung + 9,4 ccm H_2O den Schwellenwert der positiven Ninhydrinreaktion dar, der immer wieder gefunden wurde.

Daß man mit dieser Methode bei sorgfältigem Arbeiten Konzentrationsunterschiede sicher nachweisen kann, zeigen folgende Versuche mit Seidenpeptonen.

Tabelle III.

Erhitzungsdauer 70 Sek.; Luft 3 bis 4 Sek.; H_2O-Kühlung; Seidenpeptonlösung in $^0/_0$.

„Halle“	„Höchst“ I	„Höchst“ II
0,01 –	0,01 –	0,01 –
0,02 –	0,02 –	0,02 –
0,03 +	0,03 –	0,03 –
0,04 +	0,04 ?	0,04 ?
0,05 > 0,03	0,05 + > 0,04	0,05 +
0,06 > 0,04	0,06 > 0,04	0,06 +
0,07 > 0,05	0,07 > 0,06	0,07 > 0,04
0,08 > 0,06	0,08 > 0,06	0,08 > 0,06
0,09 > 0,07	0,09 > 0,07	0,09 > 0,07
0,10 > 0,08	0,10 > 0,08	0,10 > 0,08

Wenn demnach auch die Methode an sich sicher brauchbar ist, so ergeben sich bei Abbauversuchen doch Schwierigkeiten aus Folgendem. Die Farbennuance der mit Glykokolllösung erzielten Reaktion ist im Gegensatz zu der blauvioletten Reaktion der Abbaudialysate nicht ganz selten etwas mehr rotviolett gefärbt. Helligkeitsunterschiede werden dadurch etwas verwischt. Man muß deshalb eine ganze Reihe von Glykokollproben anstellen. Dann findet man jedoch mit ziemlicher Sicherheit die Grenze. Während die Dialysatproben der freiwilligen Abkühlung überlassen bleiben, kocht man die bereits vorher mit 0,2 ccm Ninhydrinlösung und H_2O auf 10,2 ccm aufgefüllten, mit Siedesteinen beschickten und passend abgestuften $^n/_{100}$-Glykokollproben, etwa 0,5, 0,7, 1,0 . . . 3,5 ccm 70 Sekunden und kühlt in fließendem Wasser. Dann bedeutet z. B. in Versuch 9, daß die in Versuch 9 mit +++ bezeichneten Reaktionen dunkler gefärbt waren als die Glykokollproben, die 0,6 bis 1,2 ccm $^n/_{100}$-Glykokoll enthielten, aber heller als alle Proben, deren Gehalt 2,3 ccm derselben Lösung überstieg. Um die geschilderte Fehlerquelle möglichst auszuschalten, wurde schließlich die Colorimetrie gleichzeitig herangezogen.

Mit Rücksicht auf die Bedürfnisse der Klinik wurde von der Anwendung komplizierter Apparate Abstand genommen und die Colorimeter von **Plesch** sowie **Autenrieth** und **Königsberger** benutzt, deren Apparat ersterem vorzuziehen ist. Der Keilkolben (**Plesch**) wurde mit der dunkelsten Lösung, der

Keil (Autenrieth-Königsberger) mit dem Gemisch der dunkelsten, sich kontrollierenden Bestimmungen gefüllt. Nacheinander wurden die helleren Lösungen in den zuvor jedesmal gereinigten und getrockneten Kolben bzw. Trog gebracht.

Wurde dann z. B. in Versuch 15 der Keil mit einem Gemisch der gleich stark gefärbten und deshalb vereinigten Ninhydrinproben aus Hülse 33 und 1 des Versuches 15, der Trog aber mit den Ninhydrinproben der Dialysate aus Hülse 4, 15 oder 18 gefüllt, so wurde ein Unterschied in der Helligkeit beider Gesichtsfeldhälften erst deutlich, wenn der Keil bis zum Teilstrich 12 der Skala des Apparats herausgezogen wurde. Beschickte man hingegen bei gleicher Keilfüllung den Trog mit den wiederum nahezu gleich stark gefärbten Ninhydrinproben der Dialysate von Hülse 18 und 25 des Versuchs 14 bzw. mit dem Dialysat aus Hülse 13, 30, 40 des Versuchs 15, so bestand gleiche Helligkeit beider Gesichtsfeldhälften wiederum im Bereiche der Teilstriche 70 und mehr = ?

Wie ohne weiteres ersichtlich ist, kann das Verfahren als quantitative Methode nur cum grano salis bezeichnet werden. Es handelt sich mehr um ein objektives Schätzungsverfahren. Es genügt aber, um diejenigen Schlußfolgerungen zu ziehen, die der Verfasser aus seinen Versuchen gezogen hat. Um aber vollends jede subjektive Deutung der Versuche auszuschließen, wurden die lediglich mit einer Zahl bezeichneten, nach absteigender Farbentiefe geordneten Ninhydrinproben unabhängig vom Verfasser fast ohne Ausnahme von Herrn Prof. May kontrolliert, dem die Bedeutung der Versuchsreihe jeweils völlig unbekannt war. Es sei deshalb auf den Versuch 10 als Beispiel einer Differenz unserer Ablesungen und auf Versuch 16 hingewiesen.

Besonders bemerkenswert ist bei diesem Versuch, daß der Buchhalter der Poliklinik, Herr Rattenhuber, hier ohne jegliche Vorbereitung seine erste colorimetrische Bestimmung ausführte. Der Zweck der Versuche war keinem der Herren bekannt. Die schriftlich niedergelegten Ergebnisse wurden erst nachträglich verglichen. Um Mißverständnissen vorzubeugen, sei bemerkt, daß die Bezeichnung + ++ +++ .... lediglich Unterschiede der Farbenintensität innerhalb der betreffenden Versuchsreihe zum Ausdruck bringen soll, abgesehen von den als solche ohne weiteres erkennbaren Versuchen.

3. Die Sulfosalicylsäureprobe diente als Eiweißreagens zur Prüfung der Hülsen auf Eiweißdichtigkeit. Toluol ist in H_2O spurenweise löslich. Dialysate von Serum oder Abbauversuchen erfahren bei Abkühlung auf Zimmertemperatur eine minimale Trübung, auch wenn das vollkommen klare Serum in nüchternem Zustande entnommen wird. Vertreibt man durch Kochen die letzten Spuren von Toluol, so nimmt diese vorher nur durch Vergleich mit H_2O erkennbare Trübung ganz wenig zu. Es handelt sich zweifellos um die Ausscheidung toluollöslicher Körper, welche aus dem Hülseninnern in die äußere Toluolschicht diffundieren. Die Gefahr einer Täuschung in positivem wie negativem Sinne ist daher gegeben. Man überzeuge sich durch Kochen des zunächst bei Zimmertemperatur mit Sulfosalicylsäure geprüften Dialysats, daß tatsächlich weder Eiweiß noch Albumosen vorliegen, indem man die erkaltete Probe 24 Stunden stehen läßt, aufschüttelt und mit der Lupe betrachtet. Die geringste Flockenbildung ist, ob in jedem Falle mit Recht, bleibe dahingestellt, als positive Eiweißprobe zu bewerten. Jedenfalls sind solche Hülsen auszuschalten.

4. Die Hülsen. Eine Eichung der Hülsen nach dem auf S. 227 dargelegten Prinzip erwies sich als undurchführbar, weil die Biuretreaktion und die Ninhydrinprobe sich, wie die Tabelle III S. 241 zeigt, nicht so scharf abgrenzen lassen, daß man mit diesen Reaktionen sichere Werte erhält und weil das Seidenpepton sich nicht in konstanter Zusammensetzung darstellen läßt. Es wurde, um Hülsen zu erhalten, die hinsichtlich ihrer Durchlässigkeit die Hülsen Abderhaldens übertreffen, in folgender Weise verfahren. Es wurde eine größere Menge der von Schleicher & Schüll bezogenen Hülsen zunächst am Rande mit nicht abwaschbarer Tinte bezeichnet, und die für Eiweiß durchlässigen wurden ausgemerzt. Die übrigen wurden nun mit den von Schöps geprüften Hülsen unter Benutzung von Seidenpepton „Halle" verglichen und eine Serie gleichmäßig durchgängiger Hülsen ausgewählt, und zwar diejenigen, die ein stärker mit Ninhydrin reagierendes Dialysat geliefert hatten als die Hülsen von Schöps. Über den Grad der Durchlässigkeit findet man die Angabe in der Literatur, daß bei Anwendung einer 1%igen Seidenpeptonlösung die Ninhydrinreaktion im Dialysat so tief gefärbt ist,

daß Unterschiede der Durchlässigkeit kaum mit Sicherheit festzustellen sind. Die gleiche Beobachtung wurde an den von Schöps bezogenen Hülsen gemacht. Sie waren demnach nicht weniger durchlässig als die von Abderhalden und anderen Forschern benutzten. Da alle Autoren darin einig sind, daß die Hülsendurchlässigkeit beim Sterilisieren sich ändert, so wurde jede Berührung mit kochendem Wasser vermieden. Nach jedesmaligem Gebrauch wurden sie durch einen kräftigen Wasserstrahl von ihrem Inhalt befreit und dann durch 24- bis 48stündiges Waschen in strömendem Wasser gereinigt. Die Prüfung mit Eiereiweiß und 4 verschiedenen Seidenpeptonen wurde in Abständen von je einem Monat bei 37° wiederholt, bevor die Versuche begannen. Nur diejenigen Hülsen, die bei dieser viermaligen Prüfung gleichmäßig durchlässig befunden wurden, sind zu Abbauversuchen benutzt worden. In der Zwischenzeit wurden sie in Chloroformwasser, das mit Toluol überschichtet war, aufbewahrt. Die verschiedenen Dialysate und die entsprechenden Hülseninhalte je einer Prüfung wurden getrennt vereinigt und aufbewahrt. Nach einjährigem Stehen sind die Dialysate klar geblieben und ließen auch mikroskopisch keine Bakterienentwicklung erkennen. Das Chloroformwasser wurde während der ganzen Versuchsdauer nicht gewechselt. Es wurde nach Beendigung der Untersuchung im Vakuum von Toluol und Chloroform befreit und bei 40° bis auf wenige Kubikzentimeter eingeengt. Diese wurden in zwei gleiche Hälften geteilt, die eine mit Ninhydrin, die andere mit der Biuretreaktion geprüft. Beide fielen negativ aus. Bei dieser Gelegenheit erfuhr Verfasser zum eigenen Schaden, daß einmal in Gebrauch genommene Hülsen, worauf Abderhalden erst in der 4. Auflage der Abwehrfermente besonders hinweist, vor Austrocknung auf das sorgfältigste bewahrt werden müssen. Vielleicht hängt das mit einer Beobachtung zusammen, die an zwei aus diesem Grunde von der Benutzung ausgeschlossenen Hülsen gemacht wurde. Von ihrer oberen Circumferenz löste sich eine farblose Lamelle ab, die, als sie in getrocknetem Zustande der Flamme genähert wurde, explosionsartig verbrannte. Es scheint demnach, als ob die Hülsen mit Kollodium getränkt sind. Kollodiummenbranen werden unbrauchbar, wenn sie austrocknen. Der Gefahr wird man vermutlich dadurch begegnen

können, daß man dem Wasser etwas Glycerin zusetzt; daß die Hülsen vor mechanischer Verletzung sorgfältig zu bewahren sind, versteht sich von selbst.

Eine einfache und zweckmäßige Hülsenkontrolle während der Versuche ist als „Hülsenwechsel“ Seite 261 beschrieben worden. Sie machte die Unterbrechung der Versuche durch Wiederholung der Prüfung unnötig. Die Hülsendurchlässigkeit bewegt sich gleichsinnig mit der Temperatur, bei der die Prüfung stattfindet. Es ist deshalb unbedingt notwendig, daß die Hülsenprüfung bei 37° vorgenommen wird.

Mit einigen Worten sei nur noch kurz auf die dem Dialysierverfahren zugrunde liegende Idee eingegangen.

Zwischen Seidenpepton und den natürlichen Abbauprodukten der Placenta bestehen, wenn man von der Annahme ausgeht, daß der der Schwangerschaftsreaktion zugrunde liegende Abbaumechanismus nach Abderhaldens Annahme verläuft, keine direkten, biologischen Beziehungen. Wäre Abderhaldens Hülsenprüfung richtig, so weist die Schwangerschaftsreaktion nur diejenigen aus Placenta durch spezifischen Fermentabbau entstandenen Spaltprodukte des spezifischen Substrats nach, welche hinsichtlich der ihr Dialysiervermögen bestimmenden Eigenschaften mit den im Seidenpepton vereinigten, dialysablen Spaltprodukten der Schwefelsäurehydrolyse von Seide identisch sind. Man erkennt auch hieraus wiederum den logischen Zusammenhang von optischer Methode, Biuretreaktion und Ninhydrinprobe und zugleich, daß als die das Diffusionsvermögen beherrschende Eigenschaft Abderhalden das Krystallisationsvermögen der Spaltprodukte betrachtet. Kolloidale Abbauprodukte sind dem Nachweis nicht zugänglich. Diese Abgrenzung ist indessen unscharf, weil sie nur für die Extreme gilt. Von welchem physikalischen oder chemischen Gesichtspunkt aus immer man den Unterschied zwischen beiden Arten von Körperklassen zu bestimmen versucht, stets wird man finden, daß beide Begriffe sich nur teilweise decken und daß die Übergänge fließende sind. Zsigmondy[1]) bezeichnet die Peptone deshalb geradezu als Semikolloide. Ganz unberechenbar aber werden die Verhältnisse, die schon bei chemisch

[1]) Kolloidchemie, Leipzig 1912.

wohl definierten Semikolloiden von einer Reihe, von Abderhalden vernachlässigter Faktoren abhängig sind — cf. Buxton und Teague, Biltz[1]) —, wenn man nun ein neues Kolloid von der individuell wechselnden, chemischen und physikalischen Beschaffenheit des Blutserums hinzufügt. Es mögen diese kurzen Andeutungen genügen, um zu zeigen, daß die Grundidee des Dialysierverfahrens, auch wenn man es von diesem Gesichtspunkt aus betrachtet, auf einer nichts weniger als exakten, experimentellen Grundlage sich aufbaut.

5. Das Serum. Das Blut wurde aus der Cubitalvene des Nüchternen mit einer in flüssigem Paraffin ausgekochten Hohlnadel entnommen, die ersten Anteile verworfen. Aufgefangen wurde das Blut in trocken sterilisierten Zentrifugengläsern aus Jenenser Glas und sofort zentrifugiert. Die Tourenzahl betrug pro Minute 4000 Umdrehungen.

Die Ablösung des Fibringerinnsels von der Glaswand erfolgte fast stets dabei spontan; wo es nicht der Fall war, genügte die Lösung eines dünnen Fibrinfadens mit ausgeglühtem Platindraht, um die Zusammenziehung des Gerinnsels zu vervollständigen.

Hämolyse wurde in keinem Falle beobachtet. Das abgeschiedene und vorsichtig abgehobene Serum wurde dann noch zweimal wiederum je 30 Minuten ausgeschleudert.

Die mikroskopische Untersuchung auf einen etwaigen Gehalt an Formelementen hat Herr Prof. May in freundlicher Weise vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde ein Tropfen Serum auf dem Objektträger in seiner natürlichen Form getrocknet und gefärbt. Es erwies sich als vollkommen frei von Zellen und Blutplättchen. Nachdem dieser Befund in den ersten vier Versuchen festgestellt war, konnte späterhin auf die mikroskopische Kontrolle verzichtet werden. Parallelversuche mit zentrifugiertem und spontan ausgepreßtem Serum ergaben vollkommen übereinstimmende Resultate (Versuch 2).

Die Inaktivierung des Serums. Die Unentbehrlichkeit des Kontrollversuchs, inaktiviertes Serum + Organ haben Oeller und Stephan[2]) bewiesen und zugleich angegeben, daß eine

---

[1]) Zit. bei Zsigmondy l. c.

[2]) Münch. med. Wochenschr. **1914**, 75.

Erhitzungsdauer von „ca. 1/2 Stunde" bei 58 bis 60° zur Erzielung der Inaktivität genüge.

Abderhalden[1]) fordert eine Temperatur von 60° und setzt die Dauer ihrer Einwirkung auf 30 Minuten fest. Später[2]) findet man dagegen als Temperatur 56 bis 58° und als Zeit 60 Minuten angegeben.

In den Versuchen 16 bis 17 wurde das Serum 1 Stunde auf 60° erwärmt; in den Versuchen 1 bis 15 hingegen wurde 45 Minuten bei 60° inaktiviert, womit den damals geltenden Vorschriften[1]) Abderhaldens und den Forderungen der genannten Autoren zweifellos vollauf Rechnung getragen ist. Dagegen fragt es sich, ob der Versuch inaktiviertes Serum + Organ überhaupt den Erwartungen entspricht, die Oeller und Stephan daran knüpfen. Wie Abderhalden selbst diesen, von Oeller und Stephan mit Recht als unentbehrlich angesehenen Versuch einschätzt, ist nicht klar zu erkennen. Seine Darlegungen verraten in dieser Richtung zweifellos eine gewisse Unsicherheit. Zum Beweise vergleiche man Abwehrfermente 3. Auflage, Seite 59 und 4. Auflage, Seite 151. Auf Seite 289 der Abwehrfermente, 4. Auflage, wird wiederum diese Kontrolle der verschärften Organprüfung gleichgestellt. Ihre somit auch von Abderhalden zwar nicht ausdrücklich — Seite 288 der 4. Auflage —, aber de facto — Seite 289 der 4. Auflage und Fermentforschung I, 1, Seite 20ff. — anerkannte, absolute — Seite 289 der 4. Auflage — Notwendigkeit und die Unklarheit über ihren Wert andrerseits stellen demnach jedenfalls einen weiteren, bedenklichen Punkt des Dialysierverfahrens dar, auf den hingewiesen werden muß.

6. Die Organe. Die Eigenschaften, die brauchbare Organe besitzen sollen, sind von Abderhalden in der 4. Auflage der „Abwehrfermente", Seite 234, in klarer Weise formuliert worden. Diese Forderungen sind zum Teil nur verständlich, wenn man mit Abderhalden annimmt, daß die Spezifizität der „scheinbar" nicht spezifischen Reaktionen eine bewiesene Tatsache sei. Die Aufgabe des Verfassers hat sich daher auf den Nachweis zu beschränken, daß er die von Abderhalden

---

[1]) Abwehrfermente S. 192, 3. Aufl.

[2]) Abwehrfermente S. 152, 4. Aufl.

vorgeschriebenen Methoden zur Organbereitung angewandt hat und beherrscht.

Ausgehend von der Vorstellung[1]), daß die Organe (Placenta) biuretgebende, dialysable und zugleich auskochbare Stoffe vorgebildet bereits enthalten, die einen Abbau vortäuschen müßten, wenn sie in das Dialysat gelangten, und in der Annahme, daß Biuretreaktion und Ninhydrinprobe sich vollwertig vertreten können, stellt Abderhalden an die Spitze seiner Forderungen, daß die Organe so lange gekocht werden müssen, bis sie sich „absolut frei" von auskochbaren, mit Ninhydrin reagierenden Substanzen erweisen. Er geht demnach von der Vorstellung aus, daß das Protoplasma der verschiedenen Gewebselemente, deren Gesamtheit das „Organ" darstellt, an sich in Wasser von 100° „absolut" unlöslich ist. Trotz aller Bemühungen ist es mir nicht gelungen, die Erfüllung dieser Forderung zu verwirklichen, bzw. Organe, die brauchbar erschienen, dauernd in diesem Zustande zu erhalten. Stets wurde bei erneutem Kochen wiederum mit Ninhydrin reagierende Substanz an das Kochwasser abgegeben. Es kann sich demnach offenbar wohl nur darum handeln, daß die Menge an auskochbaren, mit Ninhydrin reagierenden Substanzen, die brauchbare Organe an kochendes Wasser noch abgeben dürfen, ein erlaubtes Minimum nicht überschreitet, das festzustellen Aufgabe der Organprüfung ist. Nachdem diese zahllosen, vergeblichen Versuche, die mit den Erfahrungen vieler, anderer Forscher übereinstimmen, nur dazu geführt hatten, Placenten und anderes, wertvolles Material kilogrammweise zu verwerfen, obwohl das Kochwasser jedes einzelnen Organs den jeweils geltenden Prüfungsvorschriften mehr als hinreichend entsprochen hatte, setzte ich Abderhalden von dem Mißerfolg in Kenntnis und wandte mich auf seine Veranlassung an Lampé zwecks Beschaffung einer einwandsfreien Placenta, deren Prüfung dann vorzunehmen Abderhalden sich freundlichst erbot.

Eine von der Nabelvene aus entblutete und fertig gestellte Placenta, deren vollständige Befreiung von auskochbaren, mit Ninhydrin reagierenden Substanzen mir nicht gelungen

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 77, 256.

war, übergab ich Lampé zur Beurteilung. Seine Versuche, das Organ absolut frei von diesen Stoffen zu erhalten, blieben ebenfalls erfolglos, und Lampé erklärte, daß hier der zuweilen vorkommende Fall eines von Haus aus nicht verwendbaren Organs vorliege. Es wurde daher verworfen. Statt dessen wurde die frische Placenta einer gesunden Frau, Placenta II der späteren Versuche, von Lampé entblutet, sowie einschließlich zweimaligen Auskochens fertiggestellt. Die Aufgabe des Verfassers bestand demnach lediglich noch darin, das Organ endgültig zu zerkleinern und auszukochen, sowie nach den Angaben der damals erst in 3. Auflage vorliegenden „Abwehrfermente“ zu prüfen. Die gesamte Organmenge wurde zu diesem Zwecke verarbeitet. Das Organ wurde in Toluol übertragen, das bis zur Entfärbung gewechselt wurde. Nunmehr wurde die Gesamtmenge wieder ausgekocht, nachdem das Toluol durch Pressen unter Wasser zuvor möglichst entfernt worden war[1]), und ein Teil des wieder in Toluol verwahrten Organs mit der Bitte, das Organ auf seinen etwaigen Gehalt an mit Ninhydrin reagierenden, auskochbaren Substanzen zu untersuchen, an Abderhalden gesandt. Das Ergebnis dieser Untersuchung teilte mir Abderhalden mit Schreiben vom 20. II. 14 mit: „... Die übersandte Placenta war gut. In meiner Abwesenheit ist sie versehentlich zu allen möglichen Versuchen verwendet worden. Die Diagnosen stimmten immer, obwohl ganz verzwickte darunter waren ...“

Die Zuverlässigkeitsprüfung war nach Vorschrift S. 180 der 3. Auflage der „Abwehrfermente“ vorzunehmen. Da die zum Versuch nötige Organmenge nach Abderhalden $^1/_2$ bis 1 g zu jener Zeit betrug, so wurden 3,5 g des abgepreßten Organs in eine Hülse eingewogen. Sie wurde von dem Organ bis fast zum Rande erfüllt und vermochte daher überhaupt nur noch einen Bruchteil der zu diesem Versuch vorgeschriebenen Wassermenge aufzunehmen. Damit ist erwiesen, daß die Prüfung in der vorgeschriebenen Weise technisch überhaupt unausführbar ist und folglich auch in Abderhaldens Institut mit dieser Menge Organ nicht ausgeführt sein kann.

Durch einen Vorversuch mit 1,5 ccm Serum einer Schwangeren

[1]) Abwehrfermente, 4. Aufl., S. 265.

war daher zunächst diejenige Placentamenge zu ermitteln, die bei 37° in 24 Stunden, wobei 1,5 ccm desselben Serums als Kontrolle mitgeführt wurde, ein mit Ninhydrin sich intensiv färbendes Dialysat lieferte. Es ergab sich, daß 0,06 g der abgepreßten Placenta dazu genügten. Diese Organmenge entsprach auch nach meiner Schätzung annähernd jenen Mengen, die ich Lampé zu seinen Versuchen verwenden sah. Nunmehr wurden 1,3 g der trockenen Placenta, also rund die 20fache der zum Versuch notwendigen Menge, mit 5 ccm H_2O in der Hülse angesetzt und 30 statt 16 bis 20 Stunden bei 37° gegen 20 ccm Wasser dialysiert. Das Dialysat wurde eingeengt und auf 2,5 ccm, statt 5 ccm nach Abderhaldens Vorschrift, aufgefüllt, mit 1 ccm Ninhydrinlösung die Reaktion dann angestellt. Sie fiel negativ aus. Wurde nun ein zweites Dialysat, das unter den gleichen Bedingungen gewonnen war, mit 1 ccm Ninhydrinlösung eingedampft, so hinterblieb ein rot gefärbter Rückstand, der mit H_2O aufgenommen, sich mit violetter Farbe löste.

Dem etwaigen Einwand, daß die ausgeführten Versuche mit Placenta II durch inzwischen eingetretene Verderbnis des Präparates zu erklären seien, muß von vornherein die Spitze abgebrochen werden. Als nämlich meine Abbauversuche bereits im Gange waren, ersuchte mich Lampé, ihm einen Teil der Placenta II und eines Eierstockskrebses zu überlassen, der wegen seiner anatomischen Beschaffenheit sich zu Abbauversuchen in ganz hervorragender Weise eignen mußte.

Bei dieser Gelegenheit setzte ich Lampé davon in Kenntnis, daß ich auf Grund meiner bereits vorliegenden Versuche die Abderhaldensche Methodik durchaus ablehnen müsse. Herr Lampé hat mir mitzuteilen freundlichst gestattet, daß er beide überlassene Organstückchen nach der von ihm vorgenommenen Behandlung verwendbar gefunden habe und imstande war, mit der Krebsgeschwulst „einige, besonders schöne" Diagnosen stellen zu können.

Zahlreiche Versuche, die Placenta II durch erneutes Kochen „absolut" von den mit Ninhydrin reagierenden Stoffen zu befreien, waren vergeblich, gleichgültig, ob man 20-, 30-, 50 mal das Kochen wiederholte. In gleicher Weise wurden nun die übrigen, inzwischen dargestellten und behandelten Organe in

der Hülse geprüft. Alle entsprachen, wenn man die ca. 20fache Menge der zum Abbauversuch zugrunde zu legenden Menge wählte, den Forderungen der 3. Auflage, aber wenn die mit 1 ccm Ninhydrinlösung geprüften Dialysate abgedampft wurden, so hinterblieb ein Rückstand, der bei den verschiedenen Organen teils als ein leicht rosa gefärbter Hauch sich zu erkennen gab, bei anderen, namentlich den zellreichen, wie Eierstockskrebs, Hammellunge und Mandeln, stärker rot gefärbt war. Kein einziges Organ war „absolut" frei von diesen Substanzen. Ähnliche Erfahrungen mit der Prüfung nach „Abwehrfermente", Auflage 3, scheint denn auch Abderhalden gemacht zu haben. Die verschärfte Organprüfung unmittelbar vor dem Versuch nach S. 264 der 4. Auflage, die erst später in meine Hand kam, die Einführung der biologischen Prüfung, die verschiedenen Kontrollen, die Bemerkung auf S. 185 der 4. Auflage der Abwehrfermente wären unnötig, wenn die bis dahin geltenden Vorschriften ihren Zweck voll erfüllt hätten. Während früher die Unzuverlässigkeit der Hülsen neben dem Blutgehalt der Organe als Hauptfehlerquelle des Dialysierversuchs galt, ist Abderhalden, nachdem andere Autoren, wie auch meine Versuche zeigen, mit Recht Hülsenfehler ablehnten, allmählich zu der Überzeugung gekommen, daß mangelhafte Beschaffenheit der Organe in erster Linie für Fehlversuche verantwortlich zu machen ist. Nach dem Erscheinen der 4. Auflage der Abwehrfermente habe ich dann nochmals, zunächst Placenta II und den Eierstockskrebs, und später die übrigen, in meinen Versuchen verwandten Organe, soweit der Vorrat reichte, einer erneuten Prüfung unterworfen.

Prüfung von Placenta II:

1. 3 g Placenta + 5 ccm H_2O. Digestion im Kölbchen 24 Stunden bei 37°. Filtrat + Waschwasser ca. $5^1/_2$ ccm, eingeengt auf 1 ccm mit 1 ccm Ninhydrinlösung. Vom vollen Sieden an 1 Minute weiter gekocht.

Ninhydrinreaktion schwach positiv.

2. Desgl. Filtrat ca. $5^1/_2$ ccm.

Biuretreaktion nach Abderhalden +.

„ „ Oppler +.

3. 3 g Placenta + 10 ccm H_2O. Digestion im Kölbchen

24 Stunden bei 37 °. Mit 12 statt 10 ccm H_2O Rückstand vom Filtrat ausgekocht. Vereinigte Filtrate 20 ccm, eingeengt auf 1 ccm, gekocht wie 1.

Reaktion positiv.

4. Desgl. 18 ccm vereinigte Filtrate. Intensive Biuretreaktion. Auf 100 ccm verdünnt lassen 10 ccm noch eine deutliche Biuretreaktion erkennen.

5. 3 g Placenta II. Das mit Waschwässern vereinigte Filtrat wird in zwei gleiche Hälften, A und B, zu je 6,5 ccm geteilt.

A gibt positive Biuretreaktion.

B wird bis auf wenige Tropfen eingeengt, mit 1 ccm Ninhydrinlösung in ein Reagensglas gespült, das Schälchen mit 0,5 ccm Ninhydrinlösung nachgewaschen. Vom Moment des vollen Siedens an 1 Minute gekocht: Ninhydrinreaktion negativ.

Nun wurde zur Trockne verdampft: Roter Rückstand, der sich mit violetter Farbe löst.

Prüfung von 9 weiteren Organen nach S. 250 der 4. Auflage. Die Prüfung nach Auflage 3 bei Anwendung der ca. 20-fachen, zum Versuch notwendigen Menge hatten alle bestanden. Die Digestionsdauer im Kölbchen bei 37 ° betrug 24 Stunden, Kochdauer 70 Sekunden, Ablesung nach 30 Minuten.

Tabelle IV.

Nr.	Organ	Gewicht	Filtrat eingeengt auf ccm	Ninhydrinlösung 1 ccm	Bemerkungen
1	Eierstockskrebs . .	2,5	1	positiv, blauviolett	Sämtliche Filtrate leicht opalescent.
2	Magenkrebsmetastase in Lymphdrüse des Netzes	1,5	$^1/_2$	positiv, blauviolett	
3	Hammellunge, nach Lampé entblutet	2,5	1	positiv, blauviolett	Filtrat von 4 gelblich. Nach 12 Std. hat sich in sämtlichen Proben ein flockiger Niederschlag abgeschieden, der in 4 braungefärbt ist.
	Rote Blutkörperchen	2,3	1	negativ	
4	Gaumenmandeln .	2,5	1	positiv, blau	
5	Kropf, parenchym.	2,5	1	positiv, blau	
6	Hoden	1,8	$^1/_2$	negativ	
7	Brustkrebs II . .	2,5	1	intensiv positiv	
8 9	Nackenband vom Rind	2,5	1	negativ	
10	Desgl.	4,8	1	negativ	Noch stärker eingeengt, Ninhydrinreaktion +

Um einen Begriff von der Intensität dieser 9 Reaktionen zu geben, werden die abgelesenen Proben auf 10 ccm mit H_2O aufgefüllt, erneut abgelesen:

Tabelle V.

Nr.	Reaktion in 10 ccm	Mit 3 Tropfen $^n/_{10}$-Essigsäure	Kontrolle
1	eben rötlich +	Nach 12 Std. flockige Trübung	1 ccm H_2O + 1 ccm Ninhydrin gekocht, klar. Dazu nach 30 Min. 3 Tropfen $^n/_{10}$-Essigsäure: Nach 12 Std. klar.
2	—	desgl.	
3	—	desgl.	
4	—	desgl., flockige, braune Trübung	
5	eben +	desgl., flockige Trübung	
6	?	desgl.	
7	—	desgl.	
8	intensiv blau-violett	desgl., stärkste Trübung	
9	—	desgl., flockige Trübung	

Placenta I, das Originalpräparat aus Abderhaldens Institut, ging mir mit der Weisung zu, es vor Benutzung nach S. 250 der 4. Auflage der Abwehrfermente zu prüfen. Sein mit Toluol und Chloroform versetztes Kochwasser, ca. 7 ccm, wurde steril abgehoben, 2 mal durch das gleiche gehärtete Filter, Schl. u. Sch. Nr. 575, gegeben. Es blieb leicht opalescent. Mit 2 ccm des Filtrats wird in Gegenwart des Herrn Prof. May die Sulfosalicylsäureprobe in der Kälte angestellt. Die Trübung nahm zu, und nach 12 Stunden hatte sich eine kleine Menge eines feinflockigen Niederschlags abgeschieden. Mit dem Rest des Kochwassers wurde die Ninhydrinprobe angestellt, sie fiel negativ aus. Es ist somit erwiesen, daß auch dieses Präparat an sein Kochwasser lösliches Eiweiß abgegeben hat. Da die Gesamtmenge des Organs nur ca. 1,0 g betrug, wurde nach Entnahme eines Anteils für die mikroskopische Untersuchung der Rest mit 5 ccm H_2O bei 37° 24 Stunden im Kölbchen bebrütet. Das mit dem Waschwasser vereinigte Filtrat wurde auf 1 ccm eingeengt und gab dann mit 1 ccm 1%igem Ninhydrin negative Ninhydrinreaktion. Zur Trockne eingedampft hinterließ es einen schwach rot gefärbten Rückstand. Das Organ wurde sofort ca. 10- bis 20 mal ausgekocht. Sein auf 1 ccm eingeengtes Kochwasser reagierte weder mit Sulfosalicylsäure noch mit Nin-

hydrin. Es wurde dann sogleich zu den Versuchen 16 und 17 benutzt.

Aus diesen Versuchen geht mit Sicherheit hervor, daß der größte Teil der Organe, obwohl sie sämtlich den Forderungen der „Abwehrfermente“ 3. Auflage genügten, diejenigen der 4. Auflage nicht mehr voll erfüllten. Der Versuch S. 252, Nr. 10, zeigt aber weiter, daß, auch wenn die Forderung der 4. Auflage erfüllt ist, trotzdem die „absolute“ Befreiung der Organe von den genannten Stoffen nicht gewährleistet ist. Zugleich ist durch diese Versuche und durch den auf S. 249 geschilderten, vergeblichen Versuch Lampés mit der Placenta der Beweis erbracht, daß nicht etwa eine fehlerhafte Kochmethode des Verfassers, sondern die Beschaffenheit der Organe die Ursache ihres Verhaltens bildet.

Über den Zweck, den Abderhalden mit dieser Prüfungsmethode verfolgt, kann ein Zweifel nicht bestehen. Es soll verhindert werden, daß durch einfache Summation der dialysablen, mit Ninhydrin reagierenden Substanzen aus Serum und Organ ein Abbau vorgetäuscht wird. Die Ausführungen Abderhaldens S. 248 und 272 der „Abwehrfermente“, 4. Auflage, zeigen mit Sicherheit, daß die Brauchbarkeit der Organe nicht davon abhängt, daß gerade 2 bis 3 g des Organs die Forderung erfüllen, sondern daß die 5- bis 10fache Menge der im Versuch tatsächlich verwandten Organmenge im Dialysat eine positive Ninhydrinreaktion unter den Bedingungen des Dialysierversuchs vermissen lassen soll. Legt man diesen Maßstab zugrunde, so erfüllen allerdings sämtliche Organe auch die Forderung der 4. Auflage der „Abwehrfermente“. Das zeigen folgende Beispiele.

1. Placenta II.

5,4 g mit 50 ccm H_2O bei 37° 24 Stunden im Kölbchen digeriert. Der 1,3 g entsprechende Anteil des mit dem Waschwasser vereinigten Filtrats abgehoben (b). Vom Rest geben

a) 5 ccm positive Biuretreaktion, 5 ccm positive Sulfosalicylsäurereaktion, flockiger Niederschlag, 10 ccm negative Ninhydrinreaktion.

Das Übrige auf 1,5 ccm eingeengt, gegen 20 ccm H_2O 24 Stunden bei 37° dialysiert. Das Dialysat auf 22 ccm eingeengt, mit 1 ccm Ninhydrinlösung erhitzt. Nach 30 Minuten: intensive Ninhydrinreaktion.

b) Der 1,3 g entsprechende Anteil auf 1 ccm eingeengt. Ebenso dialysiert. Dialysat auf ca. 1 ccm eingeengt, mit 1 ccm Ninhydrinlösung wie a) behandelt: Ninhydrinreaktion negativ.

2. Eierstockskrebs.

27 g des frisch ausgekochten Organs werden mit 150 ccm H_2O 24 Stunden bei 37° behandelt. Filtrat + Waschwässer 360 ccm, eingeengt 27 ccm, opalescent.

Mit je 1 ccm des eingeengten Filtrats werden folgende Proben vorgenommen:

Ninhydrinprobe mit 1 ccm Ninhydrinlösung: Reaktion negativ.

Sulfosalicylsäureprobe: Reaktion positiv.

Biuretprobe: Reaktion positiv.

Millons Probe: Reaktion positiv.

Essigsäure + Ferrocyankaliumprobe: Reaktion positiv.

Auf S. 239 wurde dargelegt, warum der Schwellenwert der Ninhydrinreaktion mit dem kleinsten Wert von α-Aminocarboxylgruppen, den diese Reaktion überhaupt anzuzeigen vermag, nicht ohne weiteres identisch zu sein braucht, und daß deshalb die Außerachtlassung dieses Umstandes irrigerweise zur Annahme fehlenden Abbaus führen könnte, wenn man nicht die Serummenge so groß wählt, daß das Dialysat des Versuchs Serum allein bereits eine schwache, positive Ninhydrinreaktion erzielt. Nachdem nun weiter feststeht, daß die „absolute" Befreiung der Organe von auskochbaren, mit Ninhydrin reagierenden Substanzen unerfüllbar ist, und daß Abderhalden außer der von ihm selbst scheinbar nicht für sicher gehaltenen Kontrollprobe mit inaktiviertem Serum + Organ eine wirksame Kontrolle nicht besitzt, so ist, wenn das Dialysat von Serum allein bereits mit Ninhydrin positiv reagiert, umgekehrt der Fall denkbar, daß der geringe Gehalt eines scheinbar genügend ausgekochten Organs an dialysablen mit Ninhydrin reagierenden Stoffen als Vertiefung der an sich positiven Ninhydrinreaktion in die Erscheinung tritt und dann einen positiven Abbau vortäuscht, trotzdem es sich nur um eine Summationserscheinung handelt, hervorgerufen durch eine Menge dieser Stoffe, die für sich allein die Schwellenwertskonzentration der positiven Ninhydrinprobe nicht erreicht. Um die Größe dieser Fehlerquelle festzustellen, wurden folgende Versuche vorgenommen:

Es wurden

von Placenta II . . . . 5,2 g,
„ Eierstockskrebs . . . . . . 5,5 g,
„ Mandeln . . . . 5,3 g,
„ Hammellunge . . . . . . 5,0 g

nach ordnungsgemäßem Auskochen mit der 10fachen Menge H_2O bei 37° 24 Stunden digeriert. Die Filtrate mit ihren zugehörigen heißen Waschwässern wurden auf möglichst genau 1 ccm eingeengt und 24 Stunden gegen 20 ccm H_2O bei 37° dialysiert. Dann wurde jedes Dialysat wieder auf möglichst genau 1 ccm konzentriert und mit 1 ccm Ninhydrinlösung 1 Minute wallend gekocht. Alle reagierten nach 30 Minuten positiv. Nun wurden die Proben auf 10 ccm aufgefüllt. Sämtliche Proben waren auch jetzt noch schwach gefärbt und bildeten nach absteigender Farbenintensität geordnet obige Reihe. Die Unterschiede zwischen Placenta und Eierstockskrebs sowie zwischen Mandeln und Hammellunge waren sehr gering, aber deutlich erkennbar zwischen beiden Gruppen. In den Abbauversuchen 1 bis 15 beträgt die Placenta II-Menge 0,06 g, in den Versuchen 16 und 17 0,12 g. Es wurde nunmehr von jeder der auf 10 ccm verdünnten Ninhydrinproben ein Volumen, entsprechend dem Dialysat von 0,25 g Organ in die zu den Versuchen benutzten Jenenser Reagensgläser abgemessen und wieder auf 10 ccm aufgefüllt. In ganzer Schichthöhe, auf weißem Grunde betrachtet, waren sämtliche Proben farblos. Unter Berücksichtigung der die Ninhydrinreaktion bestimmenden Faktoren (S. 235) und unter der Voraussetzung, daß Abderhalden alle wesentlichen Faktoren in Betracht gezogen hat, und diese auch für die mit Ninhydrin reagierenden, dialysablen, auskochbaren Substanzen der Organe unverändert gelten, ist es, obwohl Summationserscheinungen sicher vorhanden sind, trotzdem völlig ausgeschlossen, daß diese Summationswirkung eine Größenordnung erreicht, die einen positiven Abbau vortäuschen kann. Ob indessen die gemachte Voraussetzung zutrifft, bleibe einstweilen dahingestellt. Jedenfalls ist hervorzuheben, daß Abderhalden die wahre Reaktion der Lösung nicht berücksichtigt hat und daß die Ninhydrinreaktion — cf. z. B. Tabelle V, S. 253, Nr 8 — nach der positiven wie negativen Seite sprunghafte Abweichungen

aufweist, die der Aufklärung bedürfen und jedenfalls nicht einfach als Versuchsfehler beiseite geschoben werden dürfen. Trotz jahrelanger Schulung in quantitativen, chemischen Untersuchungen, trotz umfassendster Vorarbeit mit chemisch wohl definierten Lösungen ist es mir nicht gelungen, stets so reine Versuchsergebnisse zu erzielen, wie sie von anderen Autoren veröffentlicht worden sind. Sogar an chemisch reinen Lösungen wurde einige Male beobachtet, daß eine ganze, in sich stimmende Farbenskala, die mit ein und derselben Glykokoll-Lösung unter stets scheinbar gleichen Bedingungen gewonnen war, in toto sich nach oben oder unter etwas verschob.

Die zahllosen Versuche, brauchbare Organe zu erzielen, zeigten, daß für das Verhalten der Organe die Art des Auskochens von großer Bedeutung ist. Kocht man kleine Proben im Reagensglas mit oder ohne Siedesteine in der Weise, wie Abderhalden es schildert[1]), so kann man in der Tat feststellen, daß die auskochbaren, mit Ninhydrin reagierenden Substanzen bei verschiedenen Organen verschieden schnell, im großen und ganzen aber etwa zwischen der 6. bis 10. Auskochung ein Minimum erreichen, das bei Fortsetzen des Auskochens noch eine verschieden lange Zeit bestehen bleibt, später aber wieder, etwa bei 20- bis 50facher Wiederholung verschwindet. Viele Organe werden dann ganz weich, nehmen schleimige Beschaffenheit an, die einzelnen Stückchen sind mit Pinzetten dann kaum mehr zu fassen. Dies Verhalten konnte an 12 Placenten, darunter Teilen von Placenta II, nachgewiesen werden. Wurden die im kleinen dargestellten, einwandsfreien und gebrauchsfertigen Proben vereinigt und nun die ganze Masse auf einmal gekocht, so ließen sie sich sofort wieder unbrauchbar machen, wenn sie unter „Stoßen" gekocht wurden und umgekehrt regenerieren. Diese Tatsachen, die ich bereits Anfang Januar 1914 festgestellt habe, erscheinen mir wichtig. Abderhaldens Vorstellung (S. 248), daß die mit Ninhydrin reagierenden, auskochbaren Substanzen vorgebildet, das Protoplasma der Organelemente hingegen in kochendem Wasser „absolut" unlöslich sei, ist mit diesen Beobachtungen schwer vereinbar. Viel näher

---

[1]) Münch. med. Wochenschr. **1914**, 237, und Abwehrfermente, 4. Aufl., S. 266.

liegt die Annahme, daß es sich nicht um einen einfachen Lösungsvorgang, sondern um eine partielle Hydrolyse handelt, die bewirkt, daß immer von neuem wieder Bestandteile des Protoplasmas in lösliche Substanzen, vorwiegend vom Charakter der Albumosen, sich verwandeln.

Das Kochen unter „Stoßen" bedeutet Siedeverzug und demnach eine Temperatur des Wassers über 100°, ein Umstand, der wohl geeignet ist, eine sonst nicht erkennbare Hydrolyse bis zum Nachweis zu beschleunigen. Daß diese Erklärung zutreffend ist, läßt sich nun außerordentlich wahrscheinlich machen. Anstatt Placenta wiederholt je 5 Minuten zu kochen, abzuspülen und wieder zu kochen, wurde ein ganz frisches Organ sofort durch Kochen sterilisiert, schnell zerkleinert, wieder sterilisiert, das Kochwasser abgegossen und nun mit reichlich Wasser mehrere Stunden unter Stoßen am Rückflußkühler gekocht, der durch Watte steril geschlossen war. Als nach dem Erkalten das Gefäß geöffnet wurde, konnte durch den Geruch H_2S nachgewiesen werden, der wohl nur aus dem Eiweiß (Cystin) unter Ausschluß bakterieller Zersetzung entstanden sein kann. Dieselbe Erscheinung beobachtet man bekanntlich an der Milch, wenn diese zu lange im Soxhletapparat sterilisiert wird. Es ist nun wohl auch verständlich, warum die quantitative Eiweißfällung durch heißes Wasser und die „absolute" Befreiung der Organe von mit Ninhydrin reagierenden, löslichen Substanzen mißlingt und warum die Angabe Abderhaldens[1]), das Kochwasser eines Organs gebe keine Biuretreaktion, wenn die Ninhydrinprobe negativ ausfalle, unrichtig ist. Man erzielt im Kochwasser trotz negativer Ninhydrinreaktion nicht nur häufig eine positive Biutretreaktion — cf. S. 255 —, sondern zugleich die verschiedensten Eiweißproben.

Die verschiedensten Kombinationen werden beobachtet. Konzentriert man ferner die von größeren Organmengen beim Bebrüten mit H_2O im Kölbchen gewonnenen Filtrate, so bilden sich flockige oder gelatinöse Rückstände, die z. T. jedenfalls aus Albumosen bestehen. Man muß nur genügend große Organmengen zu diesen Versuchen anwenden. Aus dem klaren Filtrat von 5,2 g bei 37° während 48 Stunden bebrüteten Brust-

[1]) Abwehrfermente, 3. Aufl., S. 184.

krebs II schied sich eine farblose Gelatine ab, die gegen Lackmus deutlich sauer reagierte und mit Ninhydrin sich rot färbte. Vermutlich besteht zwischen diesen, mit jedem Organ wechselnden Verhältnissen, und dem erwähnten, launenhaften Verhalten der Ninhydrinreaktion ein Zusammenhang — cf. zweiter Teil I —. In keinem Falle konnte jedoch der Durchtritt dieser Substanzen eiweiß- und albumosenartigen Charakters durch die Hülsen festgestellt werden.

Zur Technik der Organbereitung.

Man kann sich das gleichzeitige, letzte Auskochen mehrerer Organe mit kleinsten Wassermengen unmittelbar vor dem Versuch, und zwar mit erheblichem Zeitgewinn, erleichtern, wenn man eine größere, als zum Versuch nötige Organmenge in geräumige, weitmaschige Gazebeutelchen füllt, in kleinsten mit Siedesteinen beschickten Bechergläsern kocht und während des Kochens die Beutelchen durch Beschweren mit zugespitzten dicken Glasstäbchen unter Wasser hält. Krümelnde Organe, wie Blutkörperchen, gewinnt man durch Filtration zurück. Ein Parallelversuch mit Placenta II, nach Abderhalden im Reagensrohr und nach dieser Methode bereitet, zeigte — Abbauversuch 3 —, daß das Ergebnis gleich ausfiel.

Die Auswahl der Organe[1]) erfolgte von Gesichtspunkten aus, die zum großen Teil unerwähnt bleiben können, weil sie nicht mehr aktuell sind. Die Kontrolle der Placenta durch Serum Krebskranker und der Krebsgeschwülste durch Serum von Schwangeren, mit den Ausführungen der 3. Auflage der „Abwehrfermente“, S. 93, und dem Begriff einer strengen Spezifizität unvereinbar, gehört zu den von Abderhalden geforderten Kontrollen. An Stelle „reiner“, roter Blutkörperchen (S. 233) wurde aus naheliegenden Gründen der retroplacentare Bluterguß der Placenta II gewählt. Für die Anwendung von Mandeln war ihr Reichtum an Lymphzellen bestimmend. Hammellunge

[1]) Für die liebenswürdige Versorgung mit Untersuchungsmaterial erlaube ich mir, den Herren Prof. Prof. und Dr. Dr. Döderlein, Eisenreich, Haff, Flatow, Klaußner, G. Klein, Luxenburger, Krecke, Mandelbaum, F. v. Müller, H. Neumayer, Oberndorfer, von Stubenrauch auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

bietet hinsichtlich Bau, Größe der inneren Oberfläche und der Möglichkeit bequemer Entblutung manche Analogien mit Placenta. Nackenband vom Rind ist von Haus aus praktisch blutfrei; seine Ernährung erfolgt im wesentlichen auf dem Lymphwege. Es ist im Vergleich mit anderen Organen einfach gebaut und gewinnt in dieser Beziehung, weil es überhaupt erst bearbeitbar wird, wenn man die zwischen seine elastischen Fasern eingelagerten Zwischensubstanzen zerkocht. Elastisches Gewebe ist gegenüber den eiweißspaltenden Fermenten des Verdauungskanals resistent. Andererseits läßt es sich gut zu Pepton verarbeiten. Mit Ausnahme des zirka 12 Stunden nach dem Tode der Leiche entnommenen Hodens wurde ausschließlich ganz frisches Operations- und Schlachtmaterial gesunder Tiere gewählt und innerhalb kürzester Frist verarbeitet. Von Versuchen mit Gehirn, welche in den Kreis der Untersuchungen einbezogen werden sollten, wurde abgesehen, weil die Entfettung mit Tetrachlorkohlenstoff versagte. Das an sich feuchte Organ wird von dem Extraktionsmittel überhaupt nicht benetzt. Die vorherige Anwendung von Alkohol und ähnlichen Substanzen ist aber von Abderhalden verboten worden. In das Extraktionsmittel geht im wesentlichen nur der Anteil an fettartigen Substanzen über, der dabei ausgeschmolzen wird.

Organmenge: In den Abbauversuchen wurden nur die Hauptorgane abgewogen, von den Kontrollorganen Häufchen nach abgewogenen Mustern zwecks Zeitersparnis gebildet. Die Gewichtsmenge des zwischen Fließpapier nach Vorschrift abgedrückten Organs betrug in den Versuchen 1 bis 15 0,06 g, in den Versuchen 16 und 17 0,12 g.

7. Die Prüfung auf etwaigen Blutgehalt: Einige Gramm — Placenta I ausgenommen — wurden mit Eisessig zum Zerfall gebracht, mit Alkohol gefällt, dann filtriert. Das Filtrat wurde mit frisch bereiteter Guajactinktur gemischt und mit H_2O_2 unterschichtet.

8. Kontrollen:

Die Kontrolle mit inaktiviertem Serum wurde auf S. 247 bereits besprochen. Um über ihren Wert Klarheit zu schaffen, wurde ein Gemisch von aktivem und inaktivem Serum mit einem entsprechenden Pepton gleichzeitig im Polarimeter be-

obachtet. Der Hauptversuch wurde als Doppelbestimmung im Dialysierversuch durchgeführt.

Bei negativem Abbau war die von Abderhalden überhaupt nicht berücksichtigte, vorzeitige Inaktivierung des Ferments als Fehlerquelle auszuschließen. Die optische Kontrolle — cf. S. 220 — war, da die Dauer des Dialysierversuchs auf 24 Stunden ausgedehnt wurde, auf 48 Stunden zu verlängern.

Die Mitführung einer Organkontrolle ohne inaktiviertes Serum ist durch die eingehende Untersuchung der Organe unter Berücksichtigung der dabei verwandten, großen Gewichtsmengen und der bei den Abbauversuchen sich ergebenden Tatsache, daß Placenta II hinsichtlich der Menge der Abbauprodukte an der Spitze steht, überflüssig geworden. Eine neue Kontrolle, die sich als recht brauchbar erwiesen hat, wurde eingeführt und als „Hülsenwechsel“ bezeichnet. Besser als durch eine Beschreibung ergibt sich das Verfahren aus der Tabelle VI S. 270 u. 271, die den Versuchsprotokollen vorangestellt worden ist.

In dieser ist vermerkt worden, in welcher Art jede der benutzten Hülsen in den 17 Abbauversuchen gebraucht worden ist. Vergleicht man nun z. B. im Protokoll des Versuches 5 die Reaktion des Dialysats der Hülse 38 mit demjenigen von 5 2, 32, 35 einerseits und den beiden Versuchsgruppen 5 5, 15, 37 sowie 5 8, 16, 40, 42 andererseits, so ergibt sich als Schluß, daß p II und a abgebaut sind, die Hülse 38 aber undurchlässig war. Verfolgt man nun aber in entsprechender Weise die Hülse 38 in den Versuchen 6, 7, 8, 10, 11 weiter und gleichzeitig se, p und a, so zeigt sich, daß in 5 38 eine der erwähnten, sprunghaften Ninhydrinreaktionen und keine Hülsenundurchlässigkeit vorliegt. Ähnlichen Verhältnissen wird man verschiedentlich begegnen. Durch diesen „Hülsenwechsel“ in Verbindung mit der, wenn auch höchst unvollkommenen, quantitativen Ninhydrinprobe werden sämtliche Reaktionen der Versuche 1 bis 17 durch eine gegenseitige Kontrolle miteinander in Beziehung gesetzt.

Durch Wiederholung der Hülsenprüfung nach Abschluß der Abbauversuche wurde festgestellt, daß ihre Durchlässigkeit, vielleicht mit Ausnahme der Hülse 43 in Versuch 15, unverändert geblieben war.

Es sind somit für jeden der das Ergebnis bestimmenden Faktoren Bedingungen gewählt worden, die, soweit ein Vergleich bei den unbestimmten Angaben Abderhaldens überhaupt möglich ist, geeignet sind, für Biuretreaktion und Ninhydrinprobe den Anwendungsbereich zu erweitern und dem positiven Nachweis noch Fälle zugänglich zu machen, die wegen des kleineren, von Abderhalden gewählten Maßstabes dem Nachweis voraussichtlich entgehen müßten. Es ist somit alles geschehen, was zur Entscheidung der Seite 234 aufgeworfenen Fragen unter den gegebenen Umständen verlangt werden kann.

II. Die optische Methode.

A. Theoretisches.

Die Schwangerschaftsreaktion wurde von Abderhalden mit Hilfe der optischen Methode entdeckt[1]). Das Dialysierverfahren wurde erst ausgearbeitet, nachdem feststand, daß „mit der optischen Methode die Schwangerschaft mit großer Sicherheit aus dem Blut zu diagnostizieren“ möglich sei[2]). Vorausgesetzt, daß jeder Zweifel hinsichtlich der richtigen Deutung des Vorgangs mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, ist es daher selbstverständlich, daß dem Ergebnis der optischen Methode unbedingte Beweiskraft zukommt. Nach Abderhaldens Ansicht ist diese Voraussetzung gegeben und der Versuch eindeutig, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind. Erfolgreiches Arbeiten mit der Methode verlangt

1. einen empfindlichen Polarisationsapparat,
2. Vertrautheit der Untersuchers mit dem Apparat und der Methode,
3. ein einwandsfreies Pepton.

Als Instrument stand ein Polarisationsapparat von Schmidt und Haensch mit dreiteiligem Gesichtsfeld zur Verfügung, das mit Nernstlicht und Zwischenschaltung eines geradsichtigen Spektroskops monochromatisch beleuchtet wurde. Die mit Mantel versehenen Beobachtungsröhren wurden in der konstant auf

[1]) Prakt. Ergebn. d. Geburtsh. u. Gynäk. II. Jahrg. II. Abt. S. 367, 1910.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 77, 251.

37° erwärmten, drehbaren Heizvorrichtung Abderhaldens beobachtet.

Den Beweis für die vollkommene Beherrschung der Technik hat Verfasser durch Untersuchungen erbracht, die teils in Gemeinschaft mit Abderhalden[1]), teils selbständig[1]) ausgeführt worden sind.

Fehlerquellen können daher bei den nachfolgenden Untersuchungen nur insoweit eine Rolle spielen, als sie in der Natur der Sache gelegen sind, und dann vor allem durch die Beschaffenheit der Peptone bedingt sein müssen, weil es, wie Abderhalden[2]) selbst einräumt, ein sicheres Verfahren zur Gewinnung einheitlicher Substanzen nicht gibt. Peptonfehler führen nach Abderhalden zu falschen Resultaten in positivem wie negativem Sinne.

Placentapepton darf seine Anfangsdrehung nicht ändern, wenn es mit Serum sicher nicht schwangerer Individuen zusammengebracht wird. „Ist dies dennoch der Fall, dann ist das Pepton sicher nicht frei von Schwefelsäure resp. Barium!“[3]) Die Empfindlichkeit der chemischen Reaktionen auf beide Körper ist glücklicherweise so groß, daß diese biologische Reaktion entbehrlich und selbst der Ungeübte bei einiger Sorgfalt imstande ist, diese Substanzen bis auf Spuren mit Leichtigkeit aus der Lösung zu entfernen. Ein Grund, warum diese Körper, die dann ja doch nur in ungemein kleiner Menge in Form von Bariumsalzen bzw. Sulfaten der Peptone und Aminosäuren noch vorhanden sein können, eine Drehungsänderung bewirken sollen, ist ganz unverständlich. Da Serum von Haus aus Sulfate bereits enthält, so kann die einzige Wirkung dieser Spuren von Ba oder H_2SO_4 doch nur darin bestehen, daß sich unlösliches Bariumsulfat bildet oder die wahre Reaktion des Gemisches sich ändert. Diese Tatsache kann indessen keine Bedeutung haben, da Abderhalden auf diesen Punkt überhaupt kein Gewicht legt. Es wäre sonst ausgeschlossen, daß Pincussohn[4]), der langjährige Mitarbeiter Abderhaldens auf

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 58, 294; 75, 71.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 77, 252.

[3]) Abwehrf. 4. Aufl. S. 338.

[4]) Diese Zeitschr. 56, 323.

diesem speziellen Forschungsgebiet, Peptone von alkalischer Reaktion ohne Widerspruch Abderhaldens verwandte, obwohl umgekehrt die Peptone Abderhaldens gegen Lackmus neutral bis schwach sauer reagierten. In gleichem Sinne spricht die Tatsache, daß es nach Abderhalden prinzipiell gleichgültig ist, in welcher Konzentration man die Peptone anwendet und daß seine Empfehlung einer 5- bis 10%igen Lösung ausschließlich mit Rücksicht auf die Kostbarkeit dieser Substanzen erfolgte. Diese Vernachlässigung der absoluten H- bzw. OH-Ionenkonzentration der Lösung ist jedoch ganz unverständlich, weil doch gerade bei den eiweißspaltenden Fermenten die Reaktion des Mediums, wie der Schulfall von Pepsin und Trypsin sinnfällig zeigt, für die Wirkung des Ferments von weittragender Bedeutung ist.

Ein Abbau gilt ferner nach Abderhalden dann als erwiesen, wenn das Serumpeptongemisch eine Änderung seines optischen Drehungsvermögens erfährt, während die mit Serum + 0,9%iger NaCl-Lösung bzw. Peptonlösung beschickten Kontrollröhren ihre Anfangsdrehung beibehalten. Eine Drehungsänderung von 0,04° gilt, weil sie im Fehlerbereiche der Methode liegt, als unerheblich. Diese Grenze ist willkürlich und berücksichtigt nicht die Versuchsdauer. Die neutrale NaCl-Lösung gilt für die Eiweißkolloide des Serums als indifferent; für die alkalisch bis schwach sauer reagierende Peptonlösung ist jedoch diese Indifferenz nicht ohne weiteres anzunehmen. Das Serum besitzt ebenfalls optische Aktivität. Eine Drehungsänderung könnte daher an sich ebensogut ganz oder teilweise auf Kosten des Serums, und dann wohl vorwiegend seiner Eiweißkörper, wie am Pepton vor sich gehen. Diese Möglichkeit muß man durchaus in Erwägung ziehen, nachdem feststeht[1]), daß Ausflockungen von Eiweiß während des Versuchs eine Drehungsänderung bewirken. Nach allem aber, was über das Verhalten kolloidaler Lösungen bekannt ist, unterliegt es wohl keinem Zweifel, daß der dem unbewaffneten Auge als Fällung erkennbare Vorgang schon weit früher einsetzt. Die Drehungsänderung kann daher auf das Pepton dann erst mit Sicherheit bezogen werden, wenn feststeht, daß ein dem Pepton hinsichtlich aller

[1]) Abwehrf., 4. Aufl., S. 347.

seiner chemischen und physikalischen Eigenschaften gleichwertiger Zusatz zum Serum das Drehungsvermögen des letzteren unbeeinflußt läßt. Ob der von Abderhalden lediglich empfohlene Zusatz von Phosphatgemisch dazu genügt, müßte wohl erst gründlich untersucht werden. Durch Erhitzen auf 55 bis 60° „inaktiviertes“ Serum entspricht, wie die nicht ganz selten dabei zu beobachtenden Trübungen beweisen, diesen Bedingungen nicht. Serum muß auch bei dieser Temperatur in seiner chemischen Zusammensetzung, allein schon infolge von Verarmung an CO_2, sich ändern. Abderhalden[1]) hat dann eine weitere Form der Drehungsänderung beobachtet: „Wenn z. B. das Drehungsvermögen sich ganz plötzlich ändert, um dann stehen zu bleiben, dann kann man fast immer sicher sein, daß irgendeine Unregelmäßigkeit vorgekommen ist.“ Es scheint demnach, daß Abderhalden für diese Form der Drehungsänderung Versuchsfehler verantwortlich zu machen geneigt ist. Ähnliche Beobachtungen, die durch Versuchsfehler indessen nicht zu erklären sind, machte auch der Verfasser. Sie werden später besprochen werden. An dieser Stelle sei kurz erwähnt, daß es sich wahrscheinlich um Drehungsänderungen handelt, die ganz oder teilweise auf Veränderungen der Eiweißkörper des Serums zu beziehen sind. Auf jeden Fall steht fest, daß Abderhalden keine Erklärung dafür hat geben können.

Ein negativer Ausfall der Reaktion ist nach Abderhalden dann zu erwarten, wenn das Pepton infolge einer zu tief greifenden Hydrolyse durch Schwefelsäure seines spezifischen Charakters beraubt ist. Die Methode, nach der die Darstellung der Organpeptone erfolgt, unterscheidet sich in nichts von dem Verfahren der Seidenpeptonbereitung. Es ist demnach bis zum Beweise des Gegenteils die Annahme gerechtfertigt, daß in den Organpeptonen der Abbau bis zu der gleichen Stufe getrieben ist wie im Seidenpepton.

Die höchste Abbaustufe, die Abderhalden bisher aus Seidenpepton isolieren konnte, stellt ein Tetrapeptid dar. Damit ist natürlich nicht gesagt, daß nicht auch Polypeptide höherer Gattung im Seidenpepton vorhanden sein können; bleibt man aber auf dem Boden experimenteller Tatsachen, so

[1]) Abwehrf., 3. Aufl., S. 341.

steht fest, daß die Hauptmasse der im Seidenpepton vereinigten Polypeptide, was infolge der auf die hochkolloidalen Bestandteile in erster Linie wirkenden Adsorption des bei der Darstellung in der Kälte sich bildenden, nicht krystallinischen $BaSO_4$ verständlich ist, aus niedrigen Polypeptiden besteht, die dem natürlichen Ende des fermentativen Abbaus bereits ganz nahe stehen. Keines der bisher bekannten Polypeptide besitzt gegenüber Serumfermenten spezifischen Charakter. Daß Seidenpepton ein ziemlich weit abgebautes Pepton darstellt, läßt sich dadurch nachweisen, daß es mit Sulfosalicylsäure nicht reagiert im Gegensatz zu Witte-Pepton (Merck), das mit diesem Reagens bei Zimmertemperatur eine beim Erhitzen verschwindende und beim Abkühlen wieder erscheinende Trübung gibt, ein Verhalten demnach zeigt, das für Albumosen charakteristisch sein soll.

In der Tat reagieren alle diese Peptone mit Sulfosalicylsäure dementsprechend negativ. Man sollte nun erwarten, daß Abderhalden zunächst mit allen zu Gebote stehenden Mitteln die physikalischen und chemischen Konstanten bestimmt hätte, welche die Unterscheidung der spezifischen von solchen Peptonen erlauben, die infolge zu tief greifender Hydrolyse ihre spezifischen Eigenschaften verloren haben. In dem Verfahren von van Slyke, der Formoltitration nach Sörensen, der Bestimmung des optischen Drehungsvermögens, ihrer Leitfähigkeit, der quantitativen Bestimmung ihres Gehalts an Tyrosin, der Bestimmung dieser Größen im Verhältnis zu dem C-, N-, H-, O-, S-Gehalt sind, um nur einige der wichtigsten Bestimmungsmethoden zu nennen, zahlreiche Mittel gegeben, die zur Charakterisierung genügen. Das ist jedoch nicht geschehen. Nur für Placentapepton ist die Möglichkeit gegeben, brauchbare von unbrauchbaren Präparaten zu unterscheiden, durch den Vergleich mit einem, nach seiner Zusammensetzung und physikalischen Beschaffenheit nicht definierten Präparat, das nach Abderhaldens Vorschriften von den Höchster Farbwerken dargestellt und von Abderhalden als einwandsfrei anerkannt wird. Ein von dem Verfasser dargestelltes Placentapepton (Lösung II Versuch 8 u. ff.) weist das gleiche optische Drehungsvermögen auf wie Placentapepton „Höchst“, von dem es sich nur dadurch unterschied, daß der auch im Placentapepton

„Höchst" beobachtete minimale Gehalt an in H_2O nicht löslicher Substanz etwas größer, in beiden Fällen aber durch Filtration leicht zu beseitigen war. Es handelt sich aller Wahrscheinlichkeit nach um Fettsäuren.

Damit ist erwiesen, daß die von dem Verfasser dargestellten Organpeptone, die selbstverständlich auch absolut frei von Ba und H_2SO_4 waren, als einwandsfrei gelten müssen.

Andererseits steht fest, daß Abderhalden selbst mit seiner Lehre nicht in Einklang stehende Abweichungen des Reaktionsverlaufs mit der optischen Methode gefunden hat, die er in befriedigender Weise nicht aufzuklären vermag. Solange dies nicht geschehen ist, besteht kein zwingender Grund, eine Drehungsänderung ausschließlich als die Wirkung eines peptolytischen Ferments anzusehen und sie ausschließlich auf das Pepton zu beziehen. Der Abbau von Peptonen durch proteolytische Fermente ist zwar von einer Drehungsänderung begleitet, deren Richtung von der Art und Aufspaltung des Peptons abhängt, aber die Beobachtung einer Drehungsänderung berechtigt an sich nicht zu dem umgekehrten Schluß, wenn nicht, wie das bis dahin geschah, die Spaltprodukte zugleich isoliert und identifiziert werden.

Den Nachweis der Spaltprodukte auf direktem Wege haben Thar und Kotschneff[1]) sowie Abderhalden — cf. S. 216 — durch Bestimmung des Amino-N nach dem Verfahren von van Slyke zu erbringen versucht. Die Schwierigkeit dieser Methode und ihre Fehlerquellen sind, worauf schon hingewiesen wurde, an sich erheblich, so daß dem Ergebnis derartiger Versuche gegenüber Vorsicht geboten ist, das um so mehr, als die Versuchsergebnisse der 3 Autoren sich in wesentlichen Punkten widersprechen. Die erstgenannten Forscher fanden im Dialysierverfahren zwar Unterschiede bei der Einwirkung des Serums Schwangerer und Gesunder, die im Sinne einer Schwangerschaftsreaktion sprechen, dagegen fanden sie gleichzeitig auch Placentaabbau bei der Einwirkung von Nephritikerserum auf Placenta und umgekehrt Carcinom- und Lungenabbau durch das Serum Schwangerer. Dagegen konnten sie bei der Einwirkung von Schwangerenserum auf Placentapepton keinen Unterschied im

[1]) Diese Zeitschr. 69, 389.

Sinne einer Schwangerschaftsreaktion feststellen[1]) im Gegensatz zu Abderhalden, der auch in diesem Falle seine Lehre bestätigt fand. Da Abderhalden jedoch bei diesen Versuchen eine Serummenge anwandte, welche die im optischen Versuche vorgeschriebene Menge um das 3- bis 5fache übertraf, so hat er unter ganz anderen Versuchsbedingungen gearbeitet. Seine erwähnten Versuche mit Organen aber, die mit verschiedenen Methoden, darunter dem Verfahren van Slykes, gleichzeitig übereinstimmende Befunde ergeben, werden im zweiten Teil II noch zu besprechen sein. Es sei an dieser Stelle nur bemerkt daß auch hier Widersprüche mit früheren Angaben bestehen, die der Aufklärung bedürfen, bevor man diesen Versuchen irgendeine Bedeutung zuerkennen kann.

Aber selbst wenn der Beweis erbracht wäre, daß bei der Einwirkung von Serum auf Pepton der Amino-N-Gehalt sich ändert, so würde damit immer noch nicht ein Abbau des Peptons bzw. Organs bewiesen sein, da es kein Mittel bisher gibt, das unterscheiden kann, ob der Vorgang am Serumeiweiß oder dem Substrat (Pepton oder Organ) sich abspielt. Die Angabe, daß Tyrosin nachgewiesen sei, genügt nicht. Den Beweis für die Existenz der Schwangerschaftsreaktion bilden demnach Versuche, deren Deutung durchaus unsicher ist, weil die Eindeutigkeit der vermittels der optischen Methode gefundenen Drehungsänderung nicht einwandsfrei begründet ist, sondern auf Analogieschlüssen statt experimentellen Beweisen beruht. Es handelt sich demnach bestenfalles um einen Wahrscheinlichkeitsbeweis, obei gleichzeitig wichtige Tatsachen teils nicht erklärt, teilsw unberücksichtigt geblieben sind. Das eigentliche Beweismittel, daß die Ergebnisse der optischen Methode im Sinne der Lehre Abderhaldens zu deuten sind, bildet demnach genau wie beim Dialysierverfahren der praktische Erfolg, der bestritten wird und diese Deutung nur zuläßt, wenn man die Ergebnisse eben auf Grund der Abderhaldenschen Lehre erklärt. Damit ist der Beweis geführt worden, daß auch die optische Methode der a priori bereits als richtig vorausgesetzten Hypothese von der Spezifizität der Schwangerschaftsreaktion ihre Entstehung verdankt.

---

[1]) Diese Zeitschr. 63, 493, 1914.

B. Zur Technik der optischen Methode.

Die konischen Beobachtungsröhren fülle man nur so weit, daß nach Auflegen der Deckplatte eine Luftblase von 1 bis 2 mm Durchmesser bestehen bleibt. Die geringste Ungleichmäßigkeit der Mischung oder Temperatur gibt sich an einer wellenförmigen Verziehung der Trennungslinien zwischen den Feldern und einer ovalen oder unregelmäßigen Umrandung des Gesichtsfeldes zu erkennen. Die Ablesungen sind dann völlig unbrauchbar. Eine Lichtquelle von konstanter Helligkeit ist ein unbedingtes Erfordernis.

Gasnatriumlicht ist deshalb zu vermeiden.

Serum, Lösungen und Beobachtungsröhren wurden vor der Mischung und Füllung sorgfältig auf 37° vorgewärmt. Die erste Ablesung wurde $^1/_2$ Stunde nach Einlegen der Röhren in die auf 37° erwärmte Trommel vorgenommen. Etwaige Temperaturdifferenzen, die sich nach dem Gesagten sofort hätten kenntlich machen müssen, sind in dieser Zeit sicher ausgeglichen worden.

Von den Peptonen wurden 7,5 $^0/_0$ige Lösungen hergestellt, die mit gleichen Teilen Serum bzw. 0,9 $^0/_0$iger NaCl-Lösung gemischt wurden. Die 7,5 $^0/_0$igen Peptonlösungen verhielten sich gegen Lackmus neutral. Zu den Versuchen mit inaktiviertem Serum dienten Proben des gleichen inaktivierten Serums, das beim Dialysierversuch benutzt wurde.

Um Abmessungsfehler, bedingt durch die Viscosität des Serums, nach Möglichkeit zu vermeiden, müssen stets gleichartige Pipetten mittlerer Weite benutzt werden.

III. Abbauversuche.

A. Dialysierverfahren.

Der Grund, warum die nachfolgenden Abbauversuche zwar, wenn man sie in ihrer Gesamtheit überblickt, im Prinzip den aufgestellten Forderungen entsprechend durchgeführt wurden, jeder einzelne hingegen immer nur einen Teil dieser Forderungen erfüllt, ist leicht verständlich. Zum Teil war es nicht an-

gängig, den Versuchspersonen diejenigen Blutmengen zu entziehen, die zu einer lückenlosen Durchführung erforderlich waren; ferner reichte die Zeit eines Arbeitstages nicht aus, um die große Zahl der Einzelversuche vorzunehmen, vor allem aber war erst der Verlauf der Versuche selbst für einzelne Maß-

Tabelle VI zum

Hülse Nr.	Versuch									
	1	2	3	4	5	6	7	8̲	9̲	10̲
1		i	h							
2					se					
3	b	p II	a			(p II)		a		b
4		c	l			g				
5					(a)	p II	(p II)	g		
6			g			b			(e)	p II
8					p II				se	h
13	(p II)				c				b	
15					a					
16					p II	se	p II	p II		se
18					b	d				
21	se	h	c							
24				se		se		p II		
25	c	g	p II							
26	p II	se	p II						(a)	
28		p II	se						e	
29	a	(p II)	(p II)			a			(p II)	
30					e				f	
31					g				p II	(p II)
32					se					
33					p II	se	b	(p II)		g
35	e	a	se	(p II)	se				a	
37					a				se	
38					se	p II	se	se		p II
40					(p II)	e			p II	
42					p II	k				
43				p II		(a)	a	b		a

Es bedeutet:

Vers. 5 Nr. 16 p II: In Versuch 5 wurde Hülse 16 mit Placenta II + Serum aktiv gefüllt.

Vers. 5 Nr. 40 (p II): In Versuch 5 wurde Hülse 40 mit Placenta II + Serum inaktiv gefüllt.

Vers. 5 Nr. 32 se: In Versuch 5 wurde Hülse 32 mit Serum aktiv ohne Organ gefüllt.

— = Schwangere.

nahmen bestimmend. So zwang z. B. gleich der völlig unerwartete Ausfall der ersten Versuche, zunächst die optische Methode zurückzustellen und das Hauptaugenmerk auf die Ninhydrinprobe und Biuretreaktion sowie auf die Hülsenprüfung zu richten.

„Hülsenwechsel“.

Versuch							Bemerkungen
11	12	13	14	15	16	17	
		se	se	p II	p II	se	se = Serum aktiv
						p II	( ) = „ inaktiv
(p II)		p II				se	p II = Placenta II
		(p II)		p II	p I	se	p I = „ I
e					se	(p I)	a = Eierstocks-
b					se	p I	krebs
							b = Nackenband
	p II	b		se	p I	se	c = Retroplacent.
	(p II)	g		p II	se	p I	Hämatom
p II							d = Mandeln
		a	se	(p II)	(p II)	p II	e = Magenkrebs-
					p II	(p II)	metastase
							f = Brustkrebs I
		p II	(p II)				g = „ II
							h = Hammellunge
g							i = Nasenpolypen
p II							k = Hoden
		se		se	p II	se	l = Kropf
se							
	p II						
a				p II			
						p II	
h			p II				
se							
				se	se		
	se						
			se	se			

Versuch 1.

Frau Hirlanda S., 40 J. alt. H.-B. Nr. 3762/1914.
Lues, Obstipatio. Wassermann positiv.

Nr.	Hülse	Serum aktiv	Serum inaktiv	Organ	Ninhydrin-reaktion	Sulfosalicyl-säure	Biuret-reakt. Abderh.	Biuret-reakt. Oppler	Bemerkungen
1	21	1,5			+	—			Serum 6 Std.
2	26	1,5		Placenta II	++++			—	alt.
3	13		1,5	do.	+	—			
4	29	1,5		Eierstockskrebs	+++			—	
5	35	1,5		Magenkrebsmetastase in Lymphdrüse	+++	—			Hülseninhalt
6	25	1,5		Retroplacent. Bluterguß	++	—			nach 24 Std. diffus braun.
7	3	1,5		Nackenband	+	—			

Glykokollwerte:

Erhitzungsdauer 70 Sekunden, H_2O-Kühlung. Desgl. in allen folgenden Versuchen, die nach folgendem Schema zu ergänzen sind.

Farbentiefe	$^n/_{100}$-Glykokoll ccm	H_2O ccm	1 % Ninhydrin ccm
+	weniger 1,0	ad 10,0	0,2
++	1,0 bis 2,0	„ 10,0	0,2
+++	2,0 bis 3,2	„ 10,0	0,2
++++	4,0 und darüber, obere Grenze ? zu stark gefärbt	„ 10,0	0,2

Versuch 2.

Josef P., 68 J. alt. H.-B. Nr. 1893/1914.
Chronische Bronchitis.

Nr.	Hülse	Serum aktiv	Serum inaktiv	Organ	Ninhydrin-reaktion	Sulfosalicyl-säure	Biuret-reakt. Abderh.	Biuret-reakt. Oppler	Bemerkungen
1	26	1,5			—	—			Serum 6 Std. alt.
2	3	1,5		Placenta II	+++		—	—	Serum spontan ausgepreßt.
3	29		1,5	do.	+		—	—	
4	28	1,5		do.	+++	—			Serum sofort
5	35	1,5		Eierstockskrebs	+++	—			zentrifugiert.
6	25	1,5		Brustkrebs II	+			—	Eben erkennbar.
7	21	1,5		Hammellunge	++			—	
8	4	1,5		Retroplacent. Bluterguß	++	—			Hülseninhalt diffus braun.
9	1	1,5		Nasenpolypen	++	—			

Glykokollwerte:

Farbentiefe	n/100-Glykokoll ccm
—	0,0 bis 0,7
+	0,7 „ 1,0
++	1,0 „ 1,8
+++	2,0 „ 2,5

Versuch 3.

Johann O., 43 J. H.-B. Nr. 2197/1914.
Traumatische Neurasthenie oder Lues cerebri. Mit 19 Jahren Schanker. Wassermann?

Nr.	Hülse	Serum		Organ	Ninhydrin-reaktion	Sulfosalicyl-säure	Biuret-reakt.		Bemerkungen
		aktiv	inaktiv				Abderh.	Oppler	
1	28	1,5			+	—			
2	35	1,5		Kolben gesprungen					
3	25	1,5		Placenta II	+++			—	[1])
4	26	1,5		do.	+++	—			
5	29		1,5	do.	+	—			
6	3	1,5		Eierstockskrebs	+++			—	[2])
7	6	1,5		Brustkrebs II	+	—			
8	1	1,5		Hammellunge	++			—	
9	21	1,5		Retroplacentares Hämatom	++			—	[3])
10	4	1,5		Kropf III	+++	—			

Glykokollwerte siehe Versuch 4.

Versuch 4.

Michael L., 38 J. H.-B. Nr. 2244/1914 der Chirurg. Poliklinik.
Bluterguß und Fremdkörper im Kniegelenk nach Fraktur, sonst völlig gesund.

Nr.	Hülse	Serum		Organ	Ninhydrin-reaktion	Sulfosalicyl-säure	Biuret-reakt.		Bemerkungen
		aktiv	inaktiv				Abderh.	Oppler	
1	24	1,5			+	—			
2	43	1,5		Placenta II	+++			—	
2	35		1,5	do.	+			—	

---

[1]) Placenta im Beutel gekocht.
[2]) Placenta im Reagensrohr gekocht.
[3]) Hülseninhalt diffus braune Flüssigkeit.

Glykokollwerte Versuch 3 und 4.

Farbentiefe	n/100-Glykokoll ccm
+	0,6—1,0
++	1,2—2,0
+++	2,5—3,0

Versuch 5.

Josef G., 45 J. H.-B. Nr. 4128/1914.

Pyloruskrebs; erst seit kurzem Beschwerden, geringe Kachexie. 73% Hämoglobin.

Nr.	Hülse	Serum		Organ	Ninhydrinreaktion	Sulfosalicylsäure	Biuretreakt.		Bemerkungen
		aktiv	inaktiv				Abderh.	Oppler	
1	32	1,5			++	—			
2	38	1,5			—	—			
3	16	1,5		Placenta II	++++		+	—	
4	33	1,5		do.	++++		—	—	
5	42	1,5		do.	++++		+	—	
6	40		1,5	do.	+	—			
7	37	1,5		Eierstockskrebs	+++		—	—	Serum
8	5		1,5	do.	—		+	—	7 Std. alt.
9	30	1,5		Magenkrebsmetastase in Lymphdrüse	+++		?	—	
10	31	1,5		Brustkrebs II	+?	—			
11	13	1,5		Retroplacentarer Bluterguß	+++		—	—	Hülseninhalt braun.
12	18	1,5		Nackenband	++	—			
13	8	1,5		Placenta II	++++	—			
14	2	1,5			++			—	Serum
15	35	1,5			++	—			24 Std. alt.
16	15	1,5		Eierstockskrebs	+++	—			

Glykokollwerte.

Farbentiefe	n/100-Glykokoll ccm
++	0,0—1,0
+++	1,5—2,3
++++	2,3—3,0

Versuch 6.

Herr F., 40 J. Verdacht auf Magenkrebs, event. Ulcus duodeni (Prof. v. Stubenrauch). Sektion: Pankreaskrebs.

Nr.	Hülse	Serum		Organ	Ninhydrinreaktion	Sulfosalicylreaktion	Biuretreakt.		Bemerkungen
		aktiv	inaktiv				Abderh.	Oppler	
1	16	1,5			+	—			
2	24	1,5			+		—	—	
3	33	1,5			+	—			
4	5	1,5		Placenta II	++++	—			
5	38	1,5		do.	++++		—	—	
6	3		1,5	do.	+	—			
7	29	1,5		Eierstockskrebs	++++		+	—	
8	43		1,5	do.	++	—			
9	40	1,5		Magenkrebsmetastase in Lymphdrüse	+++		—	—	
10	18	1,5		Mandeln	+++	—			
11	4	1,5		Brustkrebs II (Skirrhus)	++		—	—	
12	6	1,5		Nackenband	++		—	—	
13	42	1,5		Hoden	++	—			

Glykokollwerte.

Farbentiefe	$^{n}/_{100}$-Glykokoll ccm	Bemerkungen
++	0,6—1,0	+ u. ++ } liegen so nahe zusammen, daß wegen Farbendifferenz Differenzierung nicht gelingt
+++	1,8—2,5	+++ u. ++++ }

Versuch 7.

Ludwig F., 56 J. **H.-B. Nr. 3908/1914.**
Sehr kräftiger Mann. **Verdacht auf Tabes, lanzinierende Schmerzen.**
Wassermann **schwach positiv.**

Nr.	Hülse	Serum		Organ	Ninhydrinreaktion	Sulfosalicylsäure	Biuretreakt.		Bemerkungen
		aktiv	inaktiv				Abderh.	Oppler	
1	38	1,5			+		—	—	Serum 8½ Std. alt.
2	16	1,5		Placenta II	+++	—			
3	5		1,5	do.	+		—	—	
4	43	1,5		Eierstockskrebs	++	—			
5	33	1.5		Nackenband	+		—	—	

Glykokollwerte.

Farbentiefe	n/100-Glykokoll ccm	Bemerkungen
+	0,6—0,8	
++ +++	} 2,5—3,0	++ u. +++ sehr nahe zusammen.

Versuch 8[1]).

Anna G., 27 J. H.-B. Nr. 2461/1914.
Schwangerschaft, 5. bis 6. Monat. Magen-(Duodenal?)geschwür.

Nr.	Hülse	Serum		Organ	Ninhydrin-reaktion	Sulfosalicyl-säure	Biuret-reakt.		Bemerkungen
		aktiv	inaktiv				Abderh.	Oppler	
1	38	1,5			++	—			
2	16	1,5		Placenta II	++++	—			
3	24	1,5		do.	++++		—	—	
4	33		1,5	do.	++		—	—	
5	3	1,5		Eierstockskrebs	+++	—			
6	5	1,5		Brustkrebs II	++		—	—	
7	43	1,5		Nackenband	++	—			

Versuch 9.

Gesunde Gravida, 36. bis 38. Woche, kein Verdacht auf Lues. Frauenklinik.

Nr.	Hülse	Serum		Organ	Ninhydrin-reaktion	Sulfosalicyl-säure	Biuret-reakt.		Bemerkungen
		aktiv	inaktiv				Abderh.	Oppler	
1	8	1,5			++	—			Serum 12 Std. alt.
2	37	1,5			++		—	—	
3	31	1,5		Placenta II	++++	—			
4	40	1,5		do.	++++		—	—	
5	29		1,5	do.	+?	—			
6	35	1,5		Eierstockskrebs	+++	—			
7	26		1,5	do.	++	—			
8	28	1,5		Magenkrebsmetastase in Lymphdrüse	++++		—	—	
9	6		1,5	do.	+?		—	—	
10	30	1,5		Brustdrüsenkrebs I	+++		—	—	
11	13	1,5		Nackenband	++		—	—	

[1]) Zusammen mit Versuch 9 verarbeitet.

Glykokollwerte von Versuch 8 und 9.

Farbentiefe	n/100-Glykokoll ccm	Bemerkungen
+?	} 0,6—1,0	Nicht mehr differenzierbar.
++		
+++	1,5—2,8	
++++	2,3—3,1	

Versuch 10.

Frau V., 29 J. Patientin der II. med. Klinik.
Nichtkomplizierte Schwangerschaft, 10. Woche (Diagnose Frauenklinik).

Nr.	Hülse	Serum aktiv	Serum inaktiv	Organ	Ninhydrinreaktion Oppler	Ninhydrinreaktion Prof. May	Sulfosalicylsäure	Biuretreakt. Abderh.	Biuretreakt. Oppler	Bemerkungen
1	16	1,5			+	+	—			
2	38	1,5		Placenta II	++++	++++	—			
3	6	1,5		do.	++++	+++++	—			
4	31		1,5	do.	+++	+++	—			
5	43	1,5		Eierstockskrebs	++	++++	—			
6	33	1,5		Brustdrüsenkrebs II	+	++	—			
7	8	1,5		Hammellunge	++	+++	—			
8	3	1,5		Nackenband	+	++	—			

Glykokollwerte.

Farbentiefe	n/100-Glykokoll ccm
++	1,5—1,8
++++	2,5—3,0

Colorimetrische Bestimmung (Plesch).

Hülse Nr.	%
6	100
38	100—90
31	70—40 } allmählich abnehmend
43	
8	
16	} unter 40
33	
3	

Versuch 11.

Therese V., Schwangerschaft ca. 37. Woche, vollständig gesund (Frauenklinik).

Nr.	Hülse	Serum aktiv	Serum inaktiv	Organ	Ninhydrinreaktion	Sulfosalicylsäure	Biuretreakt. Abderh.	Biuretreakt. Oppler	Bemerkungen
1	31	1,5			+		—	—	
2	38	1,5			+	—			
3	16	1,5		Placenta II	++++		} ?	—	} Rest vereinigt, davon 10 ccm zur Biuretreaktion.
4	29	1,5		do.	++++				
5	3		1,5	do.	+++	—			
6	33	1,5		Eierstockskrebs	+++	—			
7	5	1,5			++	—			
8	28	1,5			+	—			
9	37	1,5			+++	—			
10	6	1,5			+	—			

Glykokollwerte

Farbentiefe	n/100-Glykokoll ccm
+	1,3—2,0
++++	4,0—4,5 (?)

Colorimetrische Bestimmung (Plesch).

Hülse Nr.	%
16	100
29	100—90
3, 33, 37	75—55
5	55—45
6, 28, 31, 38	45—25

Versuch 12.

Josef B., 49 J. H.-B. Nr. 5340/1914.
Chronische Nephritis, Blutdruck 220. Herzhypertrophie, Harn frei von Cylindern.

Nr.	Hülse	Serum aktiv	Serum inaktiv	Organ	Ninhydrinreaktion	Sulfosalicylsäure	Biuretreakt. Abderh.	Biuretreakt. Oppler	Bemerkungen
1	42	1,5			+	—			Serum 8 Std. alt.
2	32	1,5		Placenta II	++	—			Rest 32 u. 13 vereinigt.
3	13	1,5		do.	++				
4	15		1,5	do.	+	—			

Glykokollwerte

Farbentiefe	n/100-Glykokoll ccm
+	0,6—1,0
++	3,0—3,5

Colorimetrische Bestimmung (Plesch).

Hülse Nr.	%
32	100
13	100—85
42 u. 15	unter 40

Versuch 13.

Michael S., 65 J. H.-B. Nr. 4583/1914.

Emphysem, Arteriosklerose, pleuritische Schwarte rechts. Blutdruck 165.

Nr.	Hülse	Serum aktiv	Serum inaktiv	Organ	Ninhydrinreaktion	Sulfosalicylsäure	Biuretreakt. Abderh.	Biuretreakt. Oppler	Bemerkungen
1	1	1,5			+	—			Rest 1 und 13 vereinigt.
2	30	1,5			++	—			
3	3	1,5		Placenta II	+++	—			} Rest vereinigt.
4	25	1,5		do.	+++	—			
5	4		1,5	do.	+	—			Rest 4 und 15 vereinigt.
6	18	1,5		Eierstockskrebs	+++	cf.			
7	15	1,5		Brustdrüsenkrebs II	+?	Nr. 5			
8	13	1,5		Nackenband	+?	„ 1			

Glykokollwerte.

Farbentiefe	n/100-Glykokoll ccm
+? und +	0,6—1,2
++	1,0—2,0
+++	2,3—3,0

Versuch 14.

Juliane L. Nichtkomplizierte Schwangerschaft, 3. bis 4. Monat.
Gynäkologische Poliklinik (Prof. Klein).

Nr.	Hülse	Serum aktiv	Serum inaktiv	Organ	Ninhydrinreaktion	Sulfosalicylsäure	Biuretreakt. Abderh.	Biuretreakt. Oppler	Bemerkungen
1	1	1,5			+?	—			
2	18	1,5			+	—			
3	43	1,5			++	—			
4	37	1,5		Placenta II	+++		—	—	
5	25		1,5	do.	+	—			

Glykokollwerte.

Farbentiefe	n/100-Glykokoll ccm
+? und +	0,6—1,0
+++	3,5—4,5?
	zu dunkel

Colorimetrische Bestimmung (Plesch).

Hülse Nr.	%
37	100
43	60—50
1	
18	unter 30
25	

Versuch 15[1]).

Friedrich N., 32 J. Neurasthenische Herzbeschwerden.
H.-B. Nr. 5316/1914.

Nr.	Hülse	Serum		Organ	Ninhydrin-reaktion	Sulfo-salicyl-säure	Be-merkungen
		aktiv	inaktiv				
1	13	1,5			+	—	
2	30	1,5			++	—	
3	40	1,5			+	—	
4	43	1,5			+++	?	
5	1	1,5		Placenta II	cf. Nr. 9		
6	4	1,5		do.	++++	—	
7	15	1,5		do.	++++[2])		
8	18		1,5	do.	++++	—	
9	33	1,5		do.	++++	Dialysat 33 + 1	

Glykokollwerte:

Farbentiefe	n/100-Glykokoll ccm
++++	3,5—4,0

Colorimetrische Bestimmung (Autenrieth-Königsberger)

Keilfüllung aus 33 + 1	Skalenteile
4	
15	0—12
18	
43	ca. 60—70
13	
30	
40	

[1]) Mit Versuch 16 gleichzeitig verarbeitet.
[2]) cf. Versuch 16.

Versuch 16.

Julius R., 69½ J. Ösophaguskrebs, keine Kachexie, Arteriosklerose, Prostatahypertrophie.

Nr.	Hülse	Serum aktiv	Serum inaktiv	Organ	Ninhydrin-reakt.	Sulfosalicylsäure	Biuretreaktion	Bemerkungen
1	15	1,5			+			
2	5	1,5			+	—		
3	6	1,5			+			
4	40	1,5			+			
5	1	1,5		Placenta II 0,12 g	+		—	Dialysat 1 + 30 vereinigt, davon 10 ccm
6	21	1,5		do.	+	—		
7	30	1,5		do.	+	cf. Bem.		
8	13	1,5		Placenta I 0,12 g	+	—		
9	4	1,5		do.	+	—		
10	18		1,5	Placenta II 0,12 g	+	—		
11	XV 15			cf. XV	+			

Die Ninhydrinreaktionen, geordnet nach absteigender Farbentiefe, von

Oppler	Prof. May	Dr. Grandauer	Rattenhuber	Glykokollwert, $^{n}/_{100}$-Glykokoll ccm
1 = 30	1 = 30	1 = 30	1 = 30	4—(5?) so dunkel, daß nicht bestimmbar
4	4	4	4	
XV 15	XV 15	XV 15	XV 15	
21	21	21	21	
13	13	13	13	
5	5	5	5	
40	18	18	40	
18	40	40	18	
15	15	15	6	
6	6	6	15	

Versuch 17.

Maria S., 19 J. Gesunde I-Schwangere, 38. Woche. Frauenklinik.

Nr.	Hülse	Serum aktiv	Serum inaktiv	Organ	Ninhydrinreaktion	Sulfosalicylsäure	Biuretreaktion Abderhalden	Biuretreaktion Oppler	Bemerkungen
1	1	1,5				—			
2	13	1,5				—			
3	4	1,5				—			
4	3	1,5				—			
5	30	1,5				—			
6	18	1,5		Placenta II 0,12 g			—	—	
7	35	1,5		do.	+				
8	2	1,5		do.			—	—	10 ccm der Mischung
9	6	1,5		Placenta I 0,12 g		—			
10	15	1,5		do.		—			
11	21		1,5[1]			—			[1]) 1 Stunde 60°
12	5		1,5[1]			—			
13	XVI (15 + 6 + 40)								

Die Ninhydrinreaktion, geordnet nach absteigender Tiefe.

Hülse Nr.		Glykokollwerte, $^n/_{100}$-Glykokoll ccm
18 2 = 35	Serum aktiv + Plac. II	4—(5?) nicht mehr unterscheidbar
6 15	" " + " I	
XVI (15, 6, 40)	" "	XVII demnach stärker abgebaut als XVI
1	" "	ganz schwache Reaktionen
21	" inaktiv + " II	
3	" aktiv	
5	" inaktiv + " I	
4	" aktiv	
30	" "	
13	" "	

B. Optische Methode.

Versuch 6.

Nr.	Ablesung in $^1/_{100}$ Graden	Erster Tag	Zweiter Tag		Dritter Tag	Drehungsänderung nach Std.		Anfangsdrehung		Bemerkungen
		11^00	11^00	4^00	11^00	24	48	berechnet	gefunden	
1	Placentapepton „Oppler" + Serum aktiv	− 75	− 68	− 67	− 63	+ 7	+ 12	− 78	− 75	
2	Nackenbandpepton + Serum aktiv	− 96	− 88	− 86	− 82	+ 8	+ 14	− 100	− 96	
3	Serum aktiv + 0,9 %ige NaCl-Lösung	− 36	− 35	− 35	− 36					
4	Placentapepton „Oppler" + 0,9 %ige NaCl-Lösung	− 43	− 41	− 41	− 42					
5	Nackenbandpepton + 0,9 %ige NaCl-Lösung	− 65	− 65	− 64	− 63					

Versuch 7.

Nr.	Ablesung in $^1/_{100}{}^0$	Erster Tag		Zweiter Tag				Dritter Tag	Anfangsdrehung		Bemerkungen
	Pepton aus	7^{30}	10^{00}	10^{20}	12^{20}	3^{30}	6^{00}	10^{10}	berechnet	gefunden	
1	Placenta „Oppler" + Serum aktiv	–86	–60	–80	–80	–80	–80	–76	–89	–86	Nach Beendigung vollständig klar wie Serumrest ohne Zusatz
2	Nackenband + Serum aktiv	–60	–56	–100	–101	–99	–98	–92	–110	–60	do.
3	Hammellunge + Serum aktiv	–96	–81	–86	–87	–86	–86	–81	–93	–96	do.
4	Serum aktiv + 0,9%ige NaCl-Lösung	–46	–46	–47	–48	–47	–48	–47			do.
5	Placenta „Oppler" + Serum inakt.	–91	–90	?	?	?	?	?	–89	–91	Unvollständig gelatiniert
6	Nackenband + Serum inakt.	–63?	–63	–61	–110	–109	–108	–105	–110	–63	Teilweise gelatiniert
7	Hammellunge + 0,9%ige NaCl-Lösung	–48	–46	–47	–47	–48	–47	–47	–47		Aus besonderem Versuch mit ca. 2stündigen Ablesungen eingesetzt

Versuch

Nr.	Ablesung in $^1/_{100}{}^0$ Pepton aus	Erster Tag						Zweiter
		10^{00}	11^{00}	1^{00}	3^{30}	5^{30}	7^{22}	9^{30}
1	Placenta „Oppler“[1] + Serum aktiv	−79	−78	−78	−78	−77	−77	−74
2	Nackenband + Serum aktiv	−102	−100	−100	−100	−98	−98	−95
3	Hammellunge + Serum aktiv	−86	−83	−84	−83	−83	−81	−78
4	Serum aktiv +0,9 %ige NaCl-Lösung	−40	−40	−39	−40	−40	−40	−40
5	Placenta „Oppler“ + Serum inaktiv	−80	−80	−80	−80	−79	−80	−78
6	Nackenband + Serum inaktiv	−102	−101	−102	−101	−100	−100	−98

Versuch

Nr.	Ablesung in $^1/_{100}{}^0$ Pepton aus	Erster Tag						Zweiter
		9^{30}	11^{00}	1^{00}	3^{30}	6^{12}	10^{22}	9^{30}
1	Placenta „Höchst“[1] + Serum aktiv	−80	−80	−80	−79	−77	−77	−75
2	Placenta „Oppler“ + Serum aktiv	−79	−79	−78	−78	−76	−74	−73
3	Nackenband + Serum aktiv	−100	−99	−97	−96	−95	−93	−92
4	Hammellunge + Serum aktiv	−85	−84	−84	−82	−82	−79	−79
5	Serum aktiv +0,9 %ige NaCl-Lösung	−39	−40	−40	−40	−40	−41	−41
6	Hammellunge + Serum inaktiv	−86	−86	−84	−85	−84	−84	−80

8.

Tag			Dritter Tag	Drehungs-änderung nach Stunden		Anfangsdrehung		Bemerkungen
1⁰⁰	4⁰⁰	6⁴⁵	9³⁰	24	48	be-rechnet	ge-funden	
– 72	– 72	– 72	– 72	+ 5	+ 7	– 80	– 79	[1]) Lösung II: $\alpha = -40$
– 96	– 95	– 94	– 93	+ 7	+ 9	– 104	– 102	
– 78	– 78	– 77	– 73	+ 8	+ 13	– 87	– 86	
– 40	– 40	– 41	– 40					
– 76	– 75	– 75	– 73	+ 2	+ 7	– 80	– 80	
– 98	– 97	– 96	– 94	+ 4	+ 8	– 104	– 102	

10.

Tag			Dritter Tag	Drehungs-änderung nach Stunden		Anfangsdrehung		Bemerkungen
1⁰⁰	6³⁰	10³⁰	10⁰⁰	24	48	be-rechnet	ge-funden	
– 74	– 72	– 70	– 69	+ 5	+ 11	– 80	– 80	Serum 24 Std. alt
– 72	– 71	– 69	– 69	+ 6	+ 10	– 80	– 79	[1])Durchschnittswert aus 48-stündiger Beobachtung: $\alpha = -40$
– 92	– 90	– 88	– 87	+ 8	+ 13	– 104	– 100	
– 77	– 76	– 73	– 74	+ 6	+ 11	– 87	– 85	
– 40	– 40	– 40	– 40					
– 79	– 75	– 78	– 77	+ 6	+ 11	– 87	– 86	

Versuch

Nr.	Ablesung in $^1/_{100}{}^0$ Pepton aus	Erster Tag		Zweiter Tag			Dritter
		7^{15}	10^{15}	11^{00}	5^{30}	7^{15}	10^{00}
1	Placenta „Höchst“ + Serum aktiv	— 86	— 82	— 79	— 77	— 77	— 75
2	Placenta „Oppler“ + Serum aktiv	— 86	— 81	— 78	— 76	— 76	— 74
3	Nackenband + Serum aktiv	— 107	— 103	— 97	— 96	— 96	— 93
4	Hammellunge + Serum aktiv	— 89	— 87	— 81	— 81	— 80	— 77
5	Serum aktiv + 0,9 °/₀ ige NaCl-Lösung	— 44	— 44	— 44	— 43	— 44	— 44
6	Placenta „Höchst“ + Serum inaktiv	— 88	— 87	— 84	— 84	— 84	— 81

Versuch

Nr.	Ablesung in $^1/_{100}{}^0$ Pepton aus	Erster Tag		Zweiter Tag		
		6^{20}	7^{15}	9^{45}	12^{30}	6^{20}
1	Placenta „Höchst“ + Serum aktiv	— 81	— 80	— 76	— 75	— 74
2	Placenta „Oppler“ + Serum aktiv	— 80	— 79	— 75	— 74	— 73
3	Nackenband + Serum aktiv	— 105	— 102	— 95	— 94	— 92
4	Hammellunge + Serum aktiv	— 87	— 85	— 80	— 79	— 77
5	Serum aktiv + 0,9 °/₀ ige NaCl-Lösung	— 40	— 40	— 40	— 41	— 40
6	Placenta „Höchst“ + Serum inaktiv	— 83	— 83	— 81	— 81	— 80

11.

Tag			Drehungs-änderung nach Stunden		Anfangs-drehung		Bemerkungen
1^{00}	4^{30}	7^{15}	24	48	berech-net	gefun-den	
−75	−75	−74	+9	+12	−84	−86	Serum 11 Std. alt.
−75	−74	−73	+10	+13	−84	−86	
−92	−93	−92	+11	+15	−108	−107	
−78	−77	−77	+9	+12	−91	−89	
−44	−44	−44					
−82	−82	−81	+4	+7	−84	−88	

12.

Dritter Tag			Drehungs-änderung nach Stunden		Anfangs-drehung		Bemerkungen
9^{45}	12^{30}	6^{10}	24	48	berech-net	gefun-den	
−73	−73	−72	+7	+9	−80	−81	Serum $7^1/_2$ Std. alt.
−72	−72	−70	+7	+10	−80	−80	
−90	−90	−88	+13	+17	−104	−105	
−75	−75	−74	+10	+13	−87	−87	
−40	−41	−40					
−79	−79	−77	+3	+6	−80	−83	

Versuch

Nr.	Ablesung in $^1/_{100}{}^0$ Pepton aus	Erster Tag		Zweiter Tag		
		5^{00}	7^{22}	10^{00}	12^{00}	5^{00}
1	Placenta „Höchst“ + Serum aktiv	− 84	− 83	− 79	− 79	− 78
2	Placenta „Oppler“ + Serum aktiv	− 83	− 82	− 78	− 78	− 77
3	Nackenband[1]) + Serum aktiv	− 105	− 103	− 100	− 99	− 98
4	Hammellunge + Serum aktiv	− 80	− 87	− 85?[2])	?	?
5	Serum aktiv + 0,9 %ige NaCl-Lösung	− 43	− 42	− 43	− 43	− 43
6	Placenta „Höchst“ + Serum inaktiv	− 85	− 85	− 86	− 85	− 84

Versuch

Nr.	Ablesung in $^1/_{100}{}^0$ Pepton aus	Erster Tag			Zweiter Tag		
		2^{00}	4^{15}	6^{45}	10^{30}	2^{00}	4^{00}
1	Placenta „Höchst“ + Serum aktiv	− 87	− 85	− 85	− 79	− 79	− 79
2	Placenta „Oppler“ + Serum aktiv	− 86	− 85	− 84	− 79	− 79	− 78
3	Nackenband + Serum aktiv	− 105	− 104	− 103	− 97	− 97	− 97
4	Hammellunge + Serum aktiv	− 91	− 89	− 88	− 81	− 81	− 80
5	Serum aktiv + 0,9 %ige NaCl-Lösung	− 45	− 46	− 45	− 45	− 46	− 46
6	Placenta „Oppler“ + Serum inaktiv	− 86	− 84	− 83	− 79	− 79	− 79

13.

Dritter Tag			Drehungs-änderung nach Stunden		Anfangs-drehung		Bemerkungen
9^{30}	12^{30}	5^{00}	24	48	berech-net	gefun-den	
−75	−75	−74	+6	+10	−83	−83	
−74	−74	−73	+6	+10	−83	−83	
−94	−94	−93	+7	+12	−104	−105	[1]) Neue Lösung bei 48-stündiger Beobachtung Durchschnittswert $\alpha = -61$.
?	?	?	?	?	−90	−80	[2]) Gesichtsfeld trüb.
−42	−42	−43					
−82	−82	−81	+2	+5	−83	−85	

15.

	Dritter Tag		Drehungs-änderung nach Stunden		Anfangs-drehung		Bemerkungen
6^{45}	10^{15}	2^{00}	24	48	berech-net	gefun-den	
−78	−76	−75	+8	+12	−85	−87	
−78	−75	−75	+7	+11	−85	−86	
−96	−93	−92	+8	+13	−106	−105	
−80	−77	−77	+10	+14	−92	−91	
−45	−45	−46					
−78	−75	−76	+7	+11	−85	−86	

Versuch 16.

Nr.	Ablesung in $^{1}/_{100}{}^{0}$ Pepton aus	Erster Tag	Zweiter Tag		Dritter Tag		Drehungsänderung nach Stunden		Anfangsdrehung		Bemerkungen
		6^{20}	10^{20}	6^{20}	10^{20}	6^{20}	24	48	berechnet	gefunden	
1	Placenta „Oppler" + Serum aktiv	– 84	– 80	– 79	– 77	– 76	+ 5	+ 8	– 84	– 84	
2	Nackenband + Serum aktiv	– 105	– 100	– 99	– 96	– 96	+ 6	+ 9	– 105	– 105	
3	Hammellunge + Serum aktiv	– 90	– 85	– 82	– 80	– 78	+ 8	+ 12	– 91	– 90	
4	Serum aktiv + 0,9 %ige NaCl-Lösung	– 44	– 45	– 45	– 44	– 45					
5	Placenta „Oppler" + Serum inaktiv [1])	?	?	?	?	?	?	?	– 84	?	[1]) 60° 1 Stunde, Trübung.

Versuch 17.

Nr.	Ablesung in $^{1}/_{100}{}^{0}$ Pepton aus	Erster Tag	Zweiter Tag		Dritter Tag		Drehungsänderung nach Stunden		Anfangsdrehung		Bemerkungen
		7^{00}	11^{15}	7^{00}	11^{30}	7^{00}	24	48	berechnet	gefunden	
1	Placenta „Oppler" + Serum aktiv	– 81	– 74	– 72	– 68	– 68	+ 11	+ 13	– 81	– 81	
2	Nackenband + Serum aktiv	– 103	– 92	– 91	– 86	– 85	+ 12	+ 18	– 102	– 103	
3	Hammellunge + Serum aktiv	– 88	– 77	– 75	– 71	– 70	+ 13	+ 18	– 88	– 88	
4	Serum aktiv + 0,9 %ige NaCl-Lösung	– 41	– 42	– 41	– 41	– 42					
5	Placenta „Oppler" + Serum inaktiv [1])	– 91	– 84	– 84	– 82	– 81	+ 7	+ 10	– 81	– 91	[1]) 60° 1 Stunde.
6	Nackenband + Serum inaktiv [1])	– 103	– 100	– 98	– 95	– 94	+ 5	+ 9	– 102	– 103	

IV. Diskussion der Versuche und ihr Ergebnis.

1. In den Versuchen 1 bis 17, die 6 Fälle von Schwangerschaft, eine syphilitische Nichtschwangere und 10 Männer, darunter 3 Krebskranke betreffen, hat die Ninhydrinprobe trotz ihrer deutlich zutage getretenen Unsicherheit ergeben, daß Placenta II, das von Lampé dargestellte und von Abderhalden und Lampé als brauchbar anerkannte und erfolgreich benützte Präparat, abgebaut worden ist. Placenta I, das Originalpräparat aus Abderhaldens Institut, wurde in den Versuchen 16 und 17 verwandt. Sein positiver Abbau durch das Serum eines männlichen Krebsträgers und durch Schwangerenserum ist mit der in Versuch 16 von 4 Untersuchern kontrollierten Ninhydrinprobe einwandsfrei festgestellt. Der von Lampé geprüfte und zur Krebsdiagnose mit Erfolg benützte Eierstockskrebs wurde in 4 Fällen von Schwangerschaft und in 7 Fällen von Nichtschwangerschaft geprüft. Letztere verteilen sich auf eine syphilitische Frau und 6 Männer, von denen 2 sicher Krebsträger, 4 sicher nicht an Krebs erkrankt waren. In sämtlichen 11 Fällen wurde mit Ninhydrin ein positiver Abbau nachgewiesen. Trotzdem in Versuch 16 und 17 die doppelte Placentamenge wie in den Versuchen 1 bis 15 gewählt wurde, um für die positive Biuretreaktion die denkbar günstigsten Bedingungen zu treffen und trotzdem die Ninhydrinprobe infolgedessen im Versuch 17 eine Farbentiefe erreichte, die sogar die stärkste der von Abderhalden auf Tafel II der 4. Auflage der „Abwehrfermente" verzeichneten Reaktionen noch übertraf, wurde in keinem einzigen Falle auch nur die Andeutung einer positiven Biuretreaktion gefunden, wenn sie in der beschriebenen Weise ausgeführt wurde. Dagegen traten vereinzelt unbestimmte und positive Reaktionen auf, wenn die Vorschrift Abderhaldens befolgt wurde.

Es ist somit erwiesen, daß von Abderhalden und Lampé dargestellte und zum Nachweis spezifischer Reaktionen mit vollem Erfolg angewandte Substrate ausnahmslos versagten und nicht spezifisch, sondern wahllos abgebaut wurden, als der Dialysierversuch unter Bedingungen verlief, die eine notwendige Konsequenz der Lehre Abderhaldens bilden und gleichzeitig den optimalen Bedingungen des Nachweises sowie den

aus der Fermentlehre sich ergebenden Forderungen nach Möglichkeit gerecht zu werden versuchten. Der Dialysierversuch hat weiterhin gezeigt, daß die dialysablen Abbauprodukte zwar mit Ninhydrin reagieren, dagegen die Biuretreaktion vermissen lassen, die zur sicheren Charakterisierung der Abbauprodukte als Polypeptide unentbehrlich ist. Da Abderhalden selbst den negativen Ausfall der Biuretreaktion neben positiver Ninhydrinprobe als Gegenbeweis gegen die Polypeptidnatur der Abbauprodukte anerkennt[1]) und ein über diese Körper führender Abbau den Wesenskern der Lehre von den spezifischen Abwehrfermenten, sowie die Voraussetzung für die Anwendung sowohl des Dialysierverfahrens wie der optischen Methode bedeutet, so ist durch den negativen Ausfall der Biuretreaktion, trotzdem die Bedingungen für ihren positiven Ausfall erheblich günstiger lagen als bei der von Abderhalden getroffenen Versuchsanordnung, nunmehr der direkte Beweis erbracht worden, daß[2]) Abderhaldens Lehre sowohl in der Grundidee wie auch in der Methodik verfehlt ist. Der Schwangerschaftsreaktion und der Lehre von den spezifischen Abwehrfermenten ist damit die Grundlage genommen. Sollte darüber noch ein Zweifel bestehen, so beseitigt ihn das Ergebnis der Versuche mit der optischen Methode.

2. Vermittels der optischen Methode wurde festgestellt, daß Serum Schwangerer und Nichtschwangerer, an Krebs Erkrankter und sicher nicht krebskranker Männer Placentapepton „Höchst", das von Abderhalden als einwandsfrei anerkannte Präparat, von dem Verfasser dargestelltes Placentapepton von gleicher optischer Aktivität sowie Peptone aus Hammellunge und Nackenband des Rindes ausnahmslos abgebaut hat. Nach Abderhalden gibt die optische Methode im Gegensatz zum Dialysierverfahren über die quantitativen Verhältnisse Aufschluß. Die Tabelle VII (S. 293) weist überzeugend nach, daß die absolute Drehungsänderung, die jedes der verschiedenen Serumpeptongemische in 48 Stunden erfahren hat, jeden Unterschied zwischen Schwangeren und Nichtschwangeren vermissen läßt. Dagegen sind deutliche Unterschiede von annähernd gleicher

[1]) cf. S. 212 u. 213.
[2]) cf. S. 225.

Tabelle VII.

Versuch Nr.	Drehungsänderung in $^1/_{100}{}^0$ eines Gemisches von							
	Serum				Serum		Serum	
	Schwangerer mit Placentapepton		Nichtschwangerer mit Placentapepton		Schwangerer mit Nackenbandpepton „Oppler“	Nichtschwangerer mit Nackenbandpepton „Oppler“	Schwangerer mit Lungenpepton „Oppler“	Nichtschwangerer mit Lungenpepton „Oppler“
	„Oppler“	„Höchst“	„Oppler“	„Höchst“				
6			12 (15)			14 (18)		
8	7 (8)				9 (11)		13 (14)	
10	10 (11)	11 (11)			13 (17)		11 (13)	
11	13 (15)	12 (14)			15 (16)		12 (14)	
12			10 (10)	9 (10)		17 (17)		13 (13)
13			10 (10)	10 (10)		12 (12)		?
15			11 (10)	12 (10)		13 (14)		14 (13)
16			8 (8)			9 (9)		12 (13)
17	13 (13)				18 (17)			
Summe	43 (47)	23 (25)	51 (53)	31 (30)	55 (61)	65 (70)	36 (41)	39 (39)
Mittel	10,8 (11,8)	11,5 (12,5)	10,2 (10,6)	10,3 (10)	13,8 (15,2)	13,0 (14)	12 (13,7)	13 (13)

Die eingeklammerten Zahlen würden sich ergeben, wenn die gefundene und berechnete Anfangsdrehung übereinstimmten.

Größenordnung sowohl innerhalb der Reihe der Schwangeren wie auch innerhalb der Reihe der Nichtschwangeren bei den vom Verfasser bereiteten Peptonen aus Placenta und Nackenband festzustellen. Sie würden vermutlich auch bei den anderen Peptonen zur Beobachtung gelangen, wenn die Zahl der Versuche größer wäre und noch deutlicher hervortreten, wenn die berechnete Anfangsdrehung mit der gefundenen besser übereinstimmte. Da Abderhalden das Ergebnis der optischen Methode als entscheidend anerkennt, ferner die hierbei möglichen Fehlerquellen, die Abderhalden zum Teil ohne objektiven Beweis für seiner Lehre widersprechende Versuchsergebnisse verantwortlich macht, auszuschließen sind, so ist, selbst wenn das Ergebnis der Dialysierversuche nicht vorläge, der zwingende Beweis geführt worden, daß es weder eine spezifische, noch überhaupt eine Schwangerschaftsreaktion, beruhend auf dem von Abderhalden angenommenen Abbaumechanismus, gibt, die nach Ausschluß der Spezifizität dann ja nur noch quantitativer Art sein könnte.

Nimmt man mit Abderhalden an, was jedoch noch nicht bewiesen ist, daß die Drehungsänderung ausschließlich am Pepton und nicht ganz oder teilweise am Serum abläuft und auf der

Wirkung eines peptolytischen Ferments beruht, so muß man den Schluß ziehen, daß die untersuchten Peptone die gleiche abbaufähige Substanz und die verschiedenen Sera das diese abbauende Ferment in verschiedener Konzentration besitzen, vergleichende Untersuchungen demnach zu Schlußfolgerungen erst dann berechtigen, wenn man den Gehalt der Peptone an abbaufähiger Substanz und den Fermentgehalt jedes einzelnen Serums quantitativ bestimmen kann.

3. Vergleicht man in der Tabelle VII die Drehungsänderung der Serum-Placentapepton- und Serum-Nackenbandpeptongemische, so läge nach Abderhaldens Lehre in den Versuchen 6, 12, 13, 15, 16 — Abbau von Placenta — das Beispiel einer „scheinbar“ nicht spezifischen Reaktion vor. Das zur Peptonbereitung benutzte Nackenband stellte infolge des intensiven Auskochens ein nahezu „reines“ Substrat dar, im wesentlichen nur noch aus elastischen Fasern bestehend, die daher auch die Muttersubstanz des Peptons und das Substrat der „scheinbar“ nicht spezifischen Reaktion sein müssen. Elastische Fasern findet man auch in den Wänden der Blutgefäße. Ihre Quantität aber muß, bezogen auf die gleichen Gewichtsmengen Placenta und Nackenband, in jener dann verschwindend klein sein. Der Dialysierversuch sollte daher einen stärkeren Abbau des Nackenbandes als der Placenta, entsprechend der optischen Methode, erwarten lassen. Er hat ausnahmslos das entgegengesetzte Ergebnis gezeitigt und in keinem einzigen Fall einen Abbau des Nackenbandes mit Sicherheit erkennen lassen.

In Versuch 4 wurde Placenta II durch das Serum eines im übrigen gesunden, männlichen Hämatomträgers abgebaut. Die Placenta II muß demnach Bestandteile von roten Blutkörperchen enthalten haben (cf. S. 233). Berücksichtigt man indessen die quantitativen Verhältnisse, so beweist die Tatsache, daß das zu Placenta II gehörige, retroplacentare Hämatom in den Versuchen 2, 3, 5 von Männerserum schwächer abgebaut wurde als die Placenta II selbst, trotzdem ihr etwaiger Gehalt an Bestandteilen der identischen, roten Blutkörperchen gegenüber der Hämatommenge dann verschwindend klein sein muß, daß auch in diesem Falle Abderhaldens Erklärungsversuch falsch ist. Den direkten, positiven Beweis für die

Richtigkeit dieser Schlußfolgerung hat die mikroskopische Untersuchung beider Placenten erbracht. Herr Prof. Borst hat in liebenswürdigster Weise sich der Mühe dieser Untersuchung unterzogen und mir gleichzeitig gestattet, den nachfolgenden Bericht über das Ergebnis seiner Untersuchung zu veröffentlichen. Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Borst meinen aufrichtigen Dank auch an dieser Stelle abstatten zu können.

Kgl. Pathologisches Institut der Universität München. München, den 18. Juni 1914.

Einlauf-Nr. 474.

Einsender: Dr. Berthold Oppler, Kgl. Poliklinik, München.

Sehr geehrter Herr Kollege!

Bericht über die mikroskopische Untersuchung von Placentarmaterial, welches unter der Bezeichnung Placenta I und Placenta II übergeben wurde.

Bei der makroskopischen Betrachtung fällt nur auf, daß die Placentastückchen Nr. I ein wenig mehr grauweiß, die Placentastückchen Nr. II dagegen mehr reinweiß aussehen. I und II wurden in ganz gleicher Weise entwässert, in Paraffin eingebettet und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Die mikroskopischen Präparate der Placenta I zeigen ein hochgradig verändertes Placentargewebe. Man kann zwar noch eine Unterscheidung des Bindegewebes und der Gefäße der größeren Zotten machen; aber bei den feineren Zotten ist diese Unterscheidung fast nirgends mehr durchführbar. Diese letzteren erscheinen stark geschrumpft; ihr Epithelbelag zeigt hochgradige Quellung der Zellen, die vielfach als solche gar nicht mehr zu erkennen sind, und kernlose, sich ablösende und zerfallende Schollen darstellen. Wo in diesen Epithelzellen von Kernsubstanz überhaupt noch etwas zu sehen ist, handelt es sich um äußerst blaß gefärbte, ausgelaugte Kerne oder um Kernreste in Form von kleinen Chromatinbröckeln. Die größeren Zotten zeigen am Epithel ähnliche Veränderungen, am Bindegewebe starke Auseinanderdrängung der Fasern, auch Quellung der Bindegewebsfibrillen, ferner nahezu völliger Schwund der Bindegewebszellkerne; von solchen Kernen sind nur da und dort gänzlich ausgelaugte Exemplare zu finden. In den intervillösen Räumen kein Blut, sondern nur da und dort zer-

fallende Schollen von Fibrin. Auch die Gefäße der Zotten enthalten kein Blut: die Gefäßwand ist wie aufgesplittert und die Kerne der Gefäßwandzellen sind fast nirgends mehr, und wenn überhaupt, dann nur schattenhaft darstellbar.

Die Placenta II gibt ein wesentlich anderes, mikroskopisches Bild. Hier ist überall mit Hämatoxylin noch Kernfärbung zu erzielen, sowohl am Stroma, wie am Epithel der Zotten, wie auch an den Gefäßwänden. Blut ist allerdings auch hier weder in den Gefäßen noch in den intervillösen Räumen nachweisbar. In den letzteren findet man nur Schollen von Fibrin. Wenn sich, wie eben bemerkt, in diesem Falle II die verschiedenen Gewebskerne färben ließen, so war die Färbung doch keine normale: die meisten Kerne zeigten Schrumpfung, das Chromatin speziell der Epithelzellen färbte sich sehr intensiv, eine feinere Struktur der Kerne war nicht mehr zu sehen und vielfach kamen auch Verklumpungen und schollige Zusammensinterungen des Chromatins vor. Auch an den Zellen des Stromas und der Gefäße fiel die Schrumpfung und starke Hämatoxylinfärbung auf. Während also an den genannten Gewebskernen die Erscheinungen der Schrumpfung und Pyknose hervortraten, waren die Kerne der chorialen Wanderzellen der Mehrzahl nach blaß gefärbt und schienen mehr in Auslaugung begriffen. Das Bindegewebe und die Gefäßwände zeigten im Falle II nicht die Auflockerung wie im Falle I.

Hochachtungsvoll
gez.: Prof. Borst.

Aus dem mikroskopischen Befunde geht einwandsfrei hervor, daß beide Placenten von roten Blutkörperchen vollständig frei sind. Die Hypothese der „scheinbar“ nicht spezifischen Reaktionen und mit ihr die „spezifische“ Schwangerschaftsreaktion sind demnach auch von diesem Gesichtspunkte aus auf dem direkten Wege des Versuchs endgültig erledigt. Die mikroskopische Untersuchung hat außerdem an Placenta I, dem Originalpräparat aus Abderhaldens Institut, eine hochgradige Zerstörung aufgedeckt, die mit Abderhaldens[1]) Angaben über das mikroskopische Bild der nach seinem Verfahren dargestellten Organe in unvereinbarem Widerspruch steht. Ebenso ein-

[1]) Münch. med. Wochenschr. **1914**, 2249; Fermentforschung **1**, 1, 20.

wandsfrei geht hingegen aus dem Bericht hervor, daß die Placenta II in dieser Hinsicht im wesentlichen diejenigen Merkmale aufweist, die Abderhalden von einem einwandsfreien Organ verlangt. Da beide Placenten trotz gegensätzlichen, mikroskopischen Befundes vom Serum Schwangerer und Nichtschwangerer wahllos abgebaut wurden, so ist bewiesen, daß auch die mikroskopische Kontrolle der Organe vollständig wertlos ist.

4. Aus den Versuchen mit Nackenband und Nackenband-Pepton folgt, daß der von Abderhalden behauptete und als wesentlicher Bestandteil seiner Lehre geforderte strenge Parallelismus zwischen den Ergebnissen des Dialysierversuchs und der optischen Methode nicht durchweg besteht.

Unter Berücksichtigung der sub 3 und in dem Abschnitt über die optische Methode erörterten Tatsachen erhebt sich daher die Frage, ob optische Methode und Dialysierverfahren identische, nur an verschiedenen Stufen des Abbaus einsetzende, aber an dem Substrat verlaufende Prozesse in Wirklichkeit anzeigen. In den Versuchen Nr. 6, 2., Nr. 10, 3., Nr. 11, 6., Nr. 13, 4. findet man zwischen berechneter und gefundener Anfangsdrehung eine Differenz, die in Anbetracht der Feinheit des Apparats und der großen Übung des Verfassers in polarimetrischen Bestimmungen den Fehlerbereich der Ablesung überschreitet. Völlig ausgeschlossen ist eine falsche Ablesung in dem Versuche Nr. 7, der zeigt, daß die von Abderhalden beschriebene, aber nicht erklärte, plötzliche Drehungsänderung mit nachfolgendem Stillstand mit dem hier Nr. 7, 2 bis 6 beobachteten Vorgang identisch ist, wenn man nur den 24 stündigen Verlauf zunächst betrachtet. Die Tatsache, daß in Nr. 7, 2. und 6. dieser abnorme Verlauf mit aktivem und inaktiviertem Serum gleichartig — cf. auch Versuch Nr. 16 — verlief, obwohl nur in einem der Fälle Gelatinierung ohne erkennbare Trübung erfolgte, ferner der Umstand, daß im großen und ganzen dieser gleiche Verlaufstypus mit drei verschiedenen Peptonen ohne Ausscheidung erzielt wurde, ist, wenn die Drehungsänderung durch die Wirkung eines peptolytischen Ferments bedingt wäre, ein absoluter Beweis dafür, daß die Peptone ein identisches Substrat darstellen, die Inaktivierung versagt und diese Form der Drehungs-

änderung mit den durch Ausflockung bewirkten Drehungsänderungen nichts zu tun hat.

Betrachtet man aber die letzte Ablesung, so zeigt sich, daß der Stillstand nur ein scheinbarer war und bei Verlängerung der Beobachtungsdauer wohl erkannt werden kann. Man gewinnt, wenn man die berechnete Anfangsdrehung mit den bis zum Mittag des zweiten Tages beobachteten Drehungs winkeln vergleicht, den Eindruck, daß der in Versuch Nr. 7 beobachtete Vorgang und die Differenzen, die zwischen den berechneten und beobachteten Anfangsdrehungen der zuerst genannten Versuche gefunden wurden, möglicherweise auf der gleichen Ursache beruhen, diese aber in dem Versuch Nr. 7 sich hinsichtlich der Größenwirkung und des zeitlichen Ablaufes von den übrigen Versuchen unterscheidet. Bevor diese Verhältnisse nicht experimentell klargestellt sind, hat jede Deutung der Drehungsänderung nur hypothetischen Wert.

5. Abderhaldens Methode der Seruminaktivierung hat, nach dem Ergebnis der optischen Methode zu urteilen, in einem Teil der Versuche vollständig versagt, in anderen Fällen lediglich eine Abschwächung der Wirkung, in keinem einzigen Falle eine vollständige Aufhebung derselben herbeigeführt, trotzdem in den Versuchen Nr. 16 und 17 das Serum 1 Stunde auf 60° erhitzt worden war und in den Versuchen Nr. 1 bis 15 die Art der Inaktivierung die Vorschrift von Öller und Stephan, die bereits eine Verschärfung der Abderhaldenschen Vorschrift bedeutete, noch überboten hatte. Diese Resistenz hohen Temperaturen gegenüber ist mit den Erfahrungen, die bisher an Fermenten gesammelt wurden, schwer vereinbar und bestärkt die Zweifel, die hinsichtlich der richtigen Deutung der Drehungsänderung sub 4 ausführlich dargelegt wurden. Die Versuche lassen weiterhin erkennen, daß durch die Inaktivierung das Serum erhebliche Veränderungen erleidet.

Die Dialysierversuche mit inaktiviertem Serum haben ein Ergebnis gebracht, das mit dem der optischen Methode nur teilweise in Übereinstimmung steht. Betrachtet man die Dialysierversuche als die richtigen, so folgt, daß die Drehungsänderung im optischen Versuch durch zwei verschiedene, gleichzeitig wirkende Faktoren hervorgerufen wird, von denen einer gegen die Inaktivierungstemperatur beständig ist. Erkennt man

umgekehrt das Ergebnis der optischen Methode als beweiskräftig an, so muß man den Schluß ziehen, daß infolge der Inaktivierung in dem Serum-Organgemisch die Diffusionsbedingungen sich ändern und die Kontrolle wiederum verfehlt ist, weil sie infolge dieser Veränderung der Versuchsbedingungen tatsächlich vorhandene Abbauprodukte dem Nachweis entzieht. Nachdem nunmehr Paquin[1]) in einer Mitteilung aus Abderhaldens Institut die m. E. auch vom Verfasser in eingehenden Versuchen nachgewiesene, von Abderhalden aber stets bestrittene und durch mangelhafte Beherrschung der Methode erklärte Tatsache einräumt, daß die „absolute“ Befreiung der Organe von dialysablen, mit Ninhydrin reagierenden Substanzen durch Auskochen mit Sicherheit sich nicht erzielen läßt, so ist bewiesen, daß beim Dialysierversuch stets mit einer gewissen, ohne exakte Messung nach ihrer Größe nicht bestimmbaren Summationswirkung gerechnet werden muß, daß ferner Abderhalden über eine wirksame Kontrolle, die diese Fehlerquelle qualitativ mit Sicherheit in jedem Falle zu erkennen erlaubt, bisher nicht verfügt. Da dieses unentbehrliche, quantitative Verfahren jedenfalls vor Einführung der Mikro-N-Methode vollständig fehlte, so sind alle Schlußfolgerungen aus Dialysierversuchen mit alleiniger Anwendung der Ninhydrinreaktion bedeutungslos. Die überwiegende Mehrzahl der Autoren, die die Richtigkeit der Abderhaldenschen Lehre durch den praktischen Erfolg, die richtige Diagnose von Schwangerschaft, Krebs, Geisteskrankheiten usw., bestätigt fanden, stützen ihre Annahme auf Dialysierversuche in Verbindung mit der Ninhydrinreaktion.

Dieser Hauptbeweis fällt damit in sich zusammen.

6. Trotzdem die Versuche mit der gleichen Serum- und der gleichen (Versuch 1 bis 15) bzw. doppelten Organmenge (Versuch 16 und 17) durchgeführt wurden, zeigten gleichzeitige Versuche mit verschiedenen Placenten bzw. Krebsen, daß innerhalb der gleichen Organgattung die einzelnen Präparate prinzipiell ähnliche Unterschiede der Reaktionsstärke veranlassen, wie gleiche Gewichtsmengen verschiedener Organgattungen. Ferner zeigen die Versuche, daß eine konstante Serummenge eine kon-

---

[1]) Fermentforschung **1**, 1, 58.

Tabelle

Die Differenzen der Ninhydrin-
Serum und Serum + Placenta II

Schwangere					
Versuch Nr.	Serum	Mittelwert	Serum + Plac. II	Mittelwert	Differenz
1. weibl.					
2. männl.					
3. „ } 4. „ }					
5. „					
6. „					
7. „					
8. weibl. } 9. „ }	0,6—1,0	0,8	2,3—3,1	2,7	1,9
10. „	ca. 1,0 (?)	1,0 (?)	2,5—3,0	2,7	1,7 (?)
11. „	1,3—2,0	1,2	4,0—4,5 (?)	3,1	1,9
12. männl.					
13. „					
14. weibl.	0,6—1,0	0,8	3,5—4,5 (?)	4,0	3,2
15. männl.					
16. „					
17. weibl.				sicher über	4,0

stante Menge ein und desselben Präparats — Placenta II parallel Eierstockskrebs — wie bei der optischen Methode die Peptone individuell verschieden stark abbaut. In nachfolgender Tabelle VIII — S. 300 — sind für das Dialysierverfahren die entsprechenden Werte von Placenta II übersichtlich zusammengestellt. Die angewandte Meßmethode ist zu roh, als daß sie sichere Schlußfolgerungen erlaubte. Indessen sei bemerkt, daß der stärkste Abbau an einer Schwangeren, die kleinsten Werte an Nichtschwangeren beobachtet wurden, in der Mehrzahl der Versuche die Werte bei Schwangeren und Nichtschwangeren sich gesetzlos überlagern.

7. Durch den „Hülsenwechsel“ und die Wiederholung der Hülsenprüfung nach Beendigung der Abbauversuche kann mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß Hülsenfehler in den Versuchen des Verfassers eine irgendwie nennenswerte (Ausnahme? Hülse 43, Versuch 15) Rolle spielen. Da trotzdem bei peinlichster Beobachtung gleicher Versuchsbedingungen ein launenhaftes Verhalten der Ninhydrinreaktion manchmal festzustellen ist, so muß noch ein weiterer, bisher unberücksichtigter Faktor

werte des Dialysats.
in Glykokollwerten ($^{n}/_{100}$).

Nichtschwangere				
Differenz	Mittelwert	Serum + Placenta II	Mittelwert	Serum
über 3,0	über 4,0	4,0 + ?	unter 1,0	unter 1,0
„ 1,7	„ 2,3	2,0—2,5	0,7	„ 0,7
2,0	2,8	2,5—3,0	0,8	0,6—1,0
ca. 1,7	2,7	2,3—3,0	unter 1,0	unter 1,0
1,4	2,2	1,8—2,5	0,8	0,6—1,0
2,1	2,8	2,5—3,0	0,7	0,6—0,8
2,5	3,3	3,0—3,5	0,8	0,6—1,0
1,5	2,7	2,3—3,0	1,2	{0,6—1,2 1,0—2,0
kleiner als Vers. 17 (0,12 g)				

den Verlauf der Reaktion beeinflussen. Es ist andererseits durch die Versuche 1 bis 17 der Beweis erbracht worden, daß alle die Momente, die Abderhalden als Fehlerquellen für seiner Lehre widersprechende Ergebnisse verantwortlich macht, ohne Bedeutung für die Versuche des Verfassers sind, teils, weil sie überhaupt nicht existieren bzw. dem Nachweis unzugänglich sind, teils, weil sie nachweislich vermieden wurden. Es ist somit der lückenlose Beweis geführt worden, daß es weder eine spezifische noch eine auf quantitativen Unterschieden beruhende Schwangerschaftsreaktion gibt, noch geben kann, deren Wesen in dem von Abderhalden angenommenen Abbaumechanismus besteht. Es ist ferner bewiesen, daß, selbst wenn sie bestände, ihr Nachweis erst dann möglich sein würde, wenn alle die Faktoren, die an der Reaktion beteiligt sind, in einer wissenschaftlichen Anforderungen genügenden Weise quantitativ bestimmbar wären. Da diese Wertbestimmung jedoch nur in beschränkter Weise bisher in Angriff genommen worden ist, so ist diese Bedingung zur Zeit unerfüllt. Wenn trotzdem Abderhalden und mit ihm eine große Reihe von

Forschern vermittels des Dialysierverfahrens in Verbindung mit der Ninhydrinreaktion sich von der Existenz einer derartigen Reaktion überzeugen konnten, so haben sie entweder ihre Versuche auf Grund der von Abderhalden a priori als bewiesene Tatsache angenommenen Hypothese **unbewußt** gedeutet oder der Reaktion liegt ein anderer Vorgang zugrunde, dessen Nachweis dann andere Methoden erfordert.

8. Das einzige positive Ergebnis, das diese Untersuchung zutage gefördert hat, beruht in der Bestätigung, daß die optische Methode, wenn sie nach unerläßlichen, gründlichen Vorarbeiten mit der nötigen Kritik benutzt wird, voraussichtlich die Erkenntnis der im Serum sich abspielenden Fermentprozesse in qualitativer und quantitativer Beziehung vertiefen wird.

Zweiter Teil.

I. Nachtrag zur Ninhydrinreaktion.

A. Theoretisches.

Die Darlegungen über das Dialysierverfahren führten zu dem Schluß, daß die Methode in der Ausführung Abderhaldens verfehlt ist, weil sie völlig unentschieden läßt, ob man qualitative oder quantitative Unterschiede mit dem Verfahren nachweist. Die Hoffnung, daß aus den Untersuchungen Abderhaldens ein brauchbarer Kern sich herausschälen lassen würde, wenn es gelänge, hier Klarheit zu schaffen, war die Veranlassung, einer zufälligen Beobachtung bei Versuchen mit Seidenpepton nachzugehen, die in ihren Einzelheiten übergangen werden kann und zu dem Schluß führte, daß die Ninhydrinreaktion in positivem wie negativem Sinne durch die Gegenwart außerordentlich kleiner Mengen von Stoffen beeinflußt wird, die zum Teil im Laboratoriumsstaub vorhanden sein mußten. Die weitere Feststellung, daß jede der zu verschiedensten Zeiten bezogenen und durch verschiedene Fabrikationsnummern gekennzeichneten Ninhydrinproben unmittelbar nach Herstellung der Lösung Lackmuspapier bereits spurweise rötet[1]), legte die Annahme nahe, daß der wirksame Bestandteil des Staubes in seinem Eisengehalt zu suchen sei und die Reaktion, was ohne weiteres verständlich ist, durch eine

[1]) Ewald, Fermentforschung 1, 4, 318.

Reduktion des Ninhydrin eingeleitet werden mußte. Neuberg[1]) hat denn auch bereits festgestellt, daß H in statu nascendi das Zustandekommen der Reaktion begünstigt. Die Wirkung des Laboratoriumsstaubes erwähnt auch Abderhalden. Aus der von ihm ebenfalls praktisch als berechtigt anerkannten Angabe von Deetjen und Fränkel[2]), daß bereits die geringe Löslichkeit des Glases genüge, um durch Änderung der Reaktion Störungen der Ninhydrinreaktion herbeizuführen (deshalb Jenenser Gläser), geht hervor, daß die von Halle, Löwenstein und Přibram[3]) zuerst festgestellte Wirkung der Reaktion des Mediums zweifellos volle Berücksichtigung verlangt. Abderhalden gibt dann, wie ebenfalls bereits erwähnt wurde, an, daß der Ammoniakgehalt des Serums, namentlich Krebskranker, unter Umständen ausreicht, um die Reaktion in ihrem Verlauf zu beeinflussen. Die rote Ninhydrinreaktion bezieht Abderhalden auf den Gehalt des Serums an Säuren. Die Beobachtung, daß der Lipoidgehalt der Organe die Reaktion stört, veranlaßte Pregl[4]), zur Benutzung entfetteter Organe überzugehen. Nieden[5]) erwähnt, daß die Reaktion anders verlief, wenn er anstatt mit Wasser seine Reagensgläser mit kleinen Mengen Äther reinigte. Nachdem ferner Neuberg[1]) für eine große Reihe von Stickstoff enthaltenden Substanzen nachgewiesen hat, daß die α-Aminocarboxylgruppe für den Eintritt der Reaktion nicht erforderlich ist und einzelne dieser Stoffe im Serum sicherlich vorkommen, so kann es keinem Zweifel unterliegen, daß die für die Anwendung des Ninhydrin von Abderhalden gemachte Voraussetzung, die Reaktion werde ausschließlich durch die Konzentration der α-Aminocarboxylgruppe bedingt, unhaltbar ist, und daß außer der absoluten Konzentration der reaktionsfähigen Gruppe auch die Art und Menge einer Reihe weiterer Faktoren, wie z. B. der NH_3- und Harnstoffgehalt, vor allem aber die wahre Reaktion des Mediums in physikalisch-chemischem Sinne unbedingt berücksichtigt werden müssen, wenn man auf Grund des Schwellenwertes und seines Farbentones

---

[1]) Diese Zeitschr. **56**, 500, 193 u. **67**, 58, 1914.
[2]) Münch. med. Wochenschr. **1914**, 466.
[3]) Diese Zeitschr. **55**, 357.
[4]) Fermentforschung **1**, 1, S. 9.
[5]) Münch. med. Wochenschr. **1914**, 2200.

positive und negative Reaktionen bei **konstanter Ninhydrinmenge** voneinander scheiden will. Aus den Untersuchungen von **Abderhalden** und **Lampé**[1]), sowie **Abderhalden** und **Schmidt**[2]) geht deutlich hervor, daß man von einem festen Schwellenwert der positiven Ninhydrinreaktion nicht sprechen kann, sondern daß dieser mit den Versuchsbedingungen sich verändert. Eigene Versuche zeigten, daß die blaue bis blauviolette Schwellenwertsreaktion von Seidenpepton, Polypeptiden und Aminosäuren in ihrem Farbenton in unberechenbarer Weise bereits schwankt, wenn man der Probe vor dem Erhitzen chemisch reine Neutralsalze hinzufügt, ferner, daß der Schwellenwert und sein Farbenton durch zugesetzte Spuren von H- und OH-Ionen beeinflußt wird. Besonders auffällig aber war der Einfluß, den Spuren metallischen Eisens auszuüben vermögen, wenn die Reaktion mit chemisch reinem Ammoniumcarbonat oder anderen, hydrolytisch leicht dissoziierenden Ammonsalzen vorgenommen wird. Bei Wahl geeigneter, aber wegen ihrer Kleinheit auf der analytischen Wage unbestimmbarer Eisenmengen kann man bei Luftkühlung nach 30 Minuten in der Kuppe des Reagensglases eine rote Färbung beobachten, die nach oben zu an Intensität abnimmt und über eine gelbliche oder farblose Zwischenzone allmählich in eine gegen die Oberfläche sich immer mehr vertiefende Blaufärbung übergeht. Beim Umschütteln färbt sich die Lösung im ganzen blau. In anderen Versuchen kam es vor, daß entweder schon während des Kochens oder wenige Sekunden nach Beendigung desselben die Reaktion im Verlaufe weniger Sekunden von rötlichgelb oder braun nach blau und farblos umschlug. Man hat demnach in ein und derselben Lösung positive und negative Reaktion vereinigt. Damit ist denn erwiesen, daß der Schwellenwert der Ninhydrinreaktion von der absoluten Konzentration der reaktionsfähigen N-Gruppe innerhalb einer gewissen Breite unabhängig ist und daß ferner auch der Farbenton der Reaktion zu einer scharfen Unterscheidung positiver und negativer Reaktionen an sich nicht geeignet ist. Mit Aminosäuren, Polypeptiden und Seidenpepton kann man ähn-

---

[1]) l. c.
[2]) l. c.

lich wie in den nachfolgenden Versuchen mit Ammoniumsalzen durch sinngemäße Änderung der Reaktion analoge Erscheinungen hervorrufen.

Da nun Abderhalden positive und negative Reaktionen nach Farbentiefe und Farbenton abgrenzt und als negativ alle Reaktionen bezeichnet, die eine andere als die blaue bis blauviolette Färbung aufweisen, diese jedoch durch ganz allmähliche Übergänge mit der blauen Reaktion verbunden sind und durch Änderung des H- bzw. OH-Ionengehalts ineinander sich nachträglich überführen lassen, so ist klar, daß bei diesen, von Abderhalden als negativ bezeichneten Reaktionen entweder die gleichen oder unbekannte, dann aber in ihrer Wirkung gleiche Faktoren den Verlauf auch seiner Reaktionen bestimmen müssen und daß ferner die Mikro-N-Bestimmung und die Ninhydrinreaktion sich in ihren Ergebnissen unmöglich durchaus decken können. Es unterliegt danach ferner nicht dem geringsten Zweifel, daß die Ninhydrinreaktion sich aus mehreren Einzelreaktionen zusammensetzt. Das geht auch daraus hervor, daß man mit Äther, Chloroform, Toluol usw. rötlichbraune und gelbrote Körper, die bei Gegenwart von Eisensalzen neben der blauen Verbindung entstehen, im Gegensatz zu der blauen Verbindung der wässerigen Lösung entziehen kann.

Diese Feststellungen sind für die Beurteilung der Abderhaldenschen Reaktion von Bedeutung. Sie beweisen, daß die von Abderhalden geübte Einführung immer neuer Untersuchungsmethoden die Verwirrung immer mehr steigern muß, weil jede dieser Methoden andere Ziele verfolgt, die sich mit dem jeder anderen nur teilweise decken. Es ist selbstverständlich ein erheblicher Unterschied, ob das Wesen der spezifischen Reaktion in der Bildung eines Peptons, einer Aminosäure, einer N-haltigen Substanz oder in einer Konzentrationsänderung überhaupt ohne Rücksicht auf die Natur der Substanz besteht. Andererseits eröffnet sich die Möglichkeit, daß den Angaben Abderhaldens, wofür ich aus meinen Versuchen allerdings keinen Anhaltspunkt gewinnen konnte, ein Kern richtiger Beobachtung zugrunde liegt, den Abderhalden falsch gedeutet hat, weil er unter dem Einfluß der als bewiesen vorausgesetzten Hypothese die sicher bedeutungsvolle, aber nicht allein entscheidende Konzentration der reaktionsfähigen N-Gruppe

herausgriff, dagegen die übrigen, den Reaktionsverlauf bedingenden Faktoren, deren Wirkung um so stärker ausfallen muß, je kleiner die absolute Konzentration der reaktionsfähigen N-Gruppe im Vergleich zur absoluten Konzentration jener ist, nicht erkannt bzw. praktisch vernachlässigt hat. Diese Überlegung zeigt wiederum, daß man es bei der Ninhydrinreaktion mit absoluten, und zwar gleichzeitig mit mehreren absoluten Größen zu tun hat, die nach ihrer Art bestimmbar und nach ihrer Größe meßbar sein müssen, wenn die Ninhydrinprobe brauchbar sein soll. Man wird dabei sein Augenmerk in erster Linie auf die wahre Reaktion des Dialysats und des Ninhydrin selbst bzw. seine Zersetzungsprodukte zu richten haben. Die hiermit angeschnittene Frage, ob das Wesen der Abderhaldenschen Reaktion vielleicht in dem Konzentrationsverhältnis zweier oder mehrerer dieser Faktoren von absoluter Größe zu suchen sei, ließe sich nur beantworten, wenn man zuvor den Ablauf der Ninhydrinreaktion und aller Nebenreaktionen qualitativ und quantitativ feststellen könnte, was jedoch zur Zeit nicht möglich ist. Man würde nur zu neuen Hypothesen gelangen.

Auf eine Tatsache jedoch sei noch hingewiesen, die vielleicht für die Annahme spricht, daß bei der Ninhydrinreaktion ein in der Ninhydrinlösung vorhandener oder während der Reaktion sich bildender Körper beteiligt ist. Die Ninhydrinlösung ist bei der Hülsenprüfung, den Abbauversuchen usw. stets im Überschuß vorhanden, wovon man sich leicht überzeugen kann. Es ist deshalb nicht ohne weiteres verständlich, warum dann die Anwendung einer konzentrierteren Ninhydrinlösung unter sonst gleichen Verhältnissen zu einer intensiveren Reaktion führt. Die einfachste Erklärung ist die Annahme, daß das Ninhydrin durch H_2O bereits zersetzt wird, daß ein chemisches Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Reaktionsprodukten entsteht und daß eins der Zersetzungs-(Reduktions-?)Produkte, dessen Menge mit steigender Ninhydrinmenge dann natürlich ebenfalls steigen muß, als eigentlicher Träger der Reaktion anzusprechen ist.

Für die Beurteilung der praktischen, diagnostischen Erfolge, die, wie ausführlich begründet wurde, das ausschließliche Beweismittel Abderhaldens in Wirklichkeit bilden, sind diese

Tatsachen ebenfalls insofern von Wichtigkeit, als durch den Nachweis, daß aus dem Farbenton ein Rückschluß auf die Abwesenheit der N-haltigen, reaktionsfähigen Gruppe oder auf ihre Konzentration innerhalb einer gewissen, aber nicht bestimmbaren Breite unzulässig ist, die mangels einer von Abderhalden ausdrücklich abgelehnten Vergleichslösung an sich schon dem subjektiven Ermessen völlig anheimgestellte Trennung der positiven und negativen Reaktion in bedenklicher Weise noch weiter an Unsicherheit zunimmt.

Die nachfolgende Auswahl von Versuchen ist eine Bestätigung für die Richtigkeit der auf Seite 303 angeführten Tatsachen, welche die dort erwähnten Autoren gefunden haben, und gibt ein Bild von den quantitativen Verhältnissen. Sie sind als orientierende Versuche zu bewerten, bei denen der erreichbare Grad von Genauigkeit nicht erstrebt wurde. Sie sind an sich verständlich und bedürfen daher keiner weiteren Erläuterung. Das Eisen, das aus Bequemlichkeitsgründen nicht in metallischer Form, sondern als Salzverbindung angewendet wurde, wirkt vielleicht als Katalysator, indem es abwechselnd als Ferro- und Ferri-Ion Reduktions- und Oxydationsvorgänge am Triketon beschleunigt. Die Ninhydrinlösungen wurden wie bisher, entsprechend der Vorschrift Abderhaldens, stets nur in Mengen von 10 ccm dargestellt und im Dunklen bewahrt.

1 ccm Ammoniumcarbonatlösung enthält die gleiche Menge NH_3, wie die entsprechende normale Ammoniumbicarbonatlösung ($\frac{1}{1}$ normal = 17 g NH_3 in 1000 ccm H_2O). In entsprechender Weise wurden die Eisenlösungen bereitet. Die Konzentration der $FeCl_3$-Lösung wurde aus dem Eisen- und Chlorgehalt bestimmt. Auch diese Versuche hat Herr Prof. May größtenteils zu kontrollieren die Freundlichkeit gehabt.

B. Experimentelles.

Versuch 1a.

Nr.	$^n/_{100}$-$(NH_4)HCO_3$ ccm	1% Ninhydrin ccm	H_2O ccm	Reaktion	Erhitzung	Luftkühlung
1	1,0	0,2	ad 10,2	gelb +	70 Sek.	30 Min.
2	5,0	0,2	„ 10,2	gelb ++	70 „	30 „
3	10,0	0,2	—	dunkelgelb +++	70 „	30 „

Versuch 1b.

	n/100-$(NH_4)HCO_3$ ccm	n/100-Essigsäure ccm	1% Ninhydrin ccm	H_2O ccm	Reaktion (Erhitzungsdauer 70 Sek.)
1	3,0	3,0	0,2	ad 10,2	Nach 30 Min. farblos.
2	3,0	4,0	0,2	„ 10,2	„ 30 „ „
3	3,0	5,0	0,2	„ 10,2	„ 30 „ „
4	3,0	6,0	0,2	„ 10,2	„ 30 „ „
5	3,0	7,0	0,2	—	„ 30 „ „

Versuch 2.

Nr.	n/100-$(NH_4)_2CO_3$ ccm	n/100-Ferrosulfat ccm	1% Ninhydrin ccm	H_2O ccm	Reaktion (Erhitzungsdauer 70 Sek.)	Luftkühlung
1	2,0	2,0	0,2	ad 10,2	gelb	30 Min.
2	2,0	1,0	0,2	„ 10,2	rötlich gelb	30 „
3	2,0	0,5	0,2	„ 10,2	rötlich	30 „
4	2,0	0,2	0,2	„ 10,2	stärker rot	30 „
5	2,0	0,5 n/1000-Ferrosulfat	0,2	„ 10,2	rötlich, heiß mit 5 Tropfen n/100-Essigsäure versetzt: Umschlag nach blau	30 „

Versuch 3.

Nr.	n/100-$(NH_4)_2CO_3$ ccm	n/1000-Ferrosulfat ccm	n/1000-Essigsäure ccm	1% Ninhydrin ccm	H_2O ccm	Reaktion (70 Sek. erhitzt)	Bemerkungen
1	2,0	0,5	3,0	0,2	ad 10,2	Im Kochen rot, nach 30 Min. blau	Nach 30 Min. sind 1 und 4 gleich stark blau gefärbt.
2	2,0		3,0	0,2	„ 10,2	„ „ farblos, „ 30 „ farblos	
3	2,0			0,2	„ 10,2	„ „ gelb, „ 30 „ stärker gelb	
4	2,0	0,5		0,2	„ 10,2	„ „ rot, „ 30 „ blau	
5		0,5	3,0	0,2	„ 10,2	„ „ farblos, „ 30 „ farblos	
6				0,2	„ 10,2	„ „ „ „ 30 „ „	

Versuch 4.

Nr.	n/100-$(NH_4)_2CO_3$ ccm	n/10000-Ferrosulfat ccm	1% Ninhydrin ccm	H_2O ccm	Reaktion (70 Sek. erhitzt)
1	2,0	1,0	0,2	ad 10,2	Gegen Schluß des Kochens bräunlich; nach 10 Min. ?, nach 30 Min. farblos.
2	2,0	2,0	0,2	„ 10,2	Gegen Schluß des Kochens rötlich; nach 10 Min. oben blau, in der Kuppe rot, nach 30 Min. umgeschüttelt: blau.
3	2,0	3,0	0,2	„ 10,2	Wie Nr. 2 } Die Intensität der Blaufärbung Nr. 2 bis 6 zeigt minimale Intensitätsunterschiede.
4	2,0	4,0	0,2	„ 10,2	„ „ 2
5	2,0	5,0	0,2	„ 10,2	„ „ 2
6	2,0	8,0	0,2	—	„ „ 2

Versuch 5.

Nr.	n/100-$(NH_4)_2CO_3$ ccm	n/10000 Fe.SO_4 ccm	1 % Ninhydrin ccm	H_2O ccm	Reaktion (70 Sek. Erhitzungsdauer)
1	0,2	2,0	0,2	ad 10,2	Während des Kochens farblos, nach 30 Min. farblos.
2	0,5	2,0	0,2	„ 10,2	Wie Nr. 1.
3	0,8	2,0	0,2	„ 10,2	„ „ 1.
4	1,0	2,0	0,2	„ 10,2	„ „ 1.
5	1,3	2,0	0,2	„ 10,2	Bei Beginn der Kühlung rötlich, nach 30 Min. eben erkennbar blau.
6	1,5	2,0	0,2	„ 10,2	„ „ „ „ „ „ 30 „ ?
7	1,8	2,0	0,2	„ 10,2	„ „ „ „ „ „ 30 „ blau.
8	2,0	2,0	0,2	„ 10,2	„ „ „ „ „ „ 30 „ blau, cf. Versuch 4 Nr. 2
					Nr. 7 und 8 sind deutlich stärker blau gefärbt als Nr. 5 und 6

Versuch 6.

Nr.	n/100-$(NH_4)_2CO_3$ ccm	n/10000 Fe.SO_4 ccm	1 % Ninhydrin ccm	H_2O ccm	Reaktion (70 Sek. Erhitzungsdauer)
1	2,0	4,0	0,2	ad 10,2	Nach Erhitzungsdauer 30 Sek. rötlich, nach 30 Min. blau.
2	2,0	4,0	0,2	„ 10,2	Wie Nr. 1 } Alle 4 Proben zeigen nach 30 Min. Luftkühlung gleich starke Blaufärbung, Dieselbe ist bedeutend stärker als in Nr. 7 und 8 des Versuchs 5.
3	2,0	4,0	0,2	„ 10,2	„ „ 1
4	2,0	4,0	0,2	„ 10,2	„ „ 1

Versuch 7 (cf. Versuch 9).

Einfluß des mit NH_3 verbundenen Anions.

Nr.	n/100-NH_4Cl ccm	n/10000 $FeSO_4$ ccm	1 % Ninhydrin ccm	H_2O ccm	Reaktion (70 Sek. Erhitzungsdauer)
1	2,0	4,0	0,2	ad 10,2	Während des Erhitzens farblos, nach 30 Min. farblos.
2	2,0	4,0	0,2	„ 10,2	Desgl.
	n/100-$(NH_4)HCO_3$				
3	2,0	4,0	0,2	„ 10,2	Während des Erhitzens rötlich, nach 30 Min. typisch blau.
4	2,0	4,0	0,2	„ 10,2	Desgl.
	n/100-$(NH_4)_2CO_3$				
5	2,0	4,0	0,2	„ 10,2	Desgl.
6	2,0	4,0	0,2	„ 10,2	Desgl.

Die Farbentiefe entspricht einer mittelstarken Ninhydrinreaktion:

$3 = 4 > 5 = 6.$

$5 = 6 =$ Nr. 1 bis 4 des Versuchs 6.

Versuch 8.

Nr.	$^n/_{100}$ $(NH_4)HCO_3$ ccm	$^n/_{100}$ $(NH_4)_2CO_3$ ccm	$^n/_{100}$ Essigsäure ccm	$^n/_{10000}$ $FeSO_4$ ccm	Ninhydrin 1% ccm	H_2O	Reaktion (70 Sek. Erhitzungsdauer)
1	2,0			4,0	0,2	ad 10,2	Während des Erhitzens rötlich, nach 30 Min. bläulich
2	2,0			4,0	0,2	„ 10,2	desgl.
3		2,0		4,0	0,2	„ 10,2	desgl.
4		2,0		4,0	0,2	„ 10,2	desgl.
5		2,0	1,0	4,0	0,2	„ 10,2	desgl.
6		2,0	1,0	4,0	0,2	„ 10,2	desgl.

1 = 2 > 3 = 4 = 5 = 6.

Versuch 9a.

Nr.	$^n/_{100}$ $(NH_4)_2CO_3$ ccm	$^n/_{100000}$ $FeCl_3$ ccm	Ninhydrin 1% ccm	H_2O	Reaktion (70 Sek. Erhitzungsdauer)	Bemerkungen
1	4,0	1,0	0,2	ad 10,2	Während des Erhitzens gelblich, nach 30 Min. bräunlichgelb	1—6 zeigen schrittweise Abnahme der Gelbfärbung
2	4,0	2,0	0,2	„ 10,2	desgl., nach 30 Min. gelb	
3	4,0	4,0	0,2	„ 10,2	desgl.	
4	4,0	6,0	0,2	„ 10,2	desgl.	
5	4,0	0,8 $^n/_{10000}$	0,2	„ 10,2	desgl.	
6	4,0	1,0 „	0,2	„ 10,2	desgl.	
7	4,0	2,0 „	0,2	„ 10,2	Während des Erhitzens bräunlich, nach 30 Min. blauviolett	— 79 zeigen schrittweise Zunahme der Blauviolettfärbung. Die Grenze des Farbenumschlags muß zwisch. Nr. 6 u. 7 liegen.
8	4,0	4,0 „	0,2	„ 10,2	desgl.	
9	4,0	6,0 „	0,2	—	desgl.	

Versuch 9b.

Aufsuchung der Grenze.

Nr.	$^n/_{100}$ $(NH_4)_2CO_3$ ccm	$^n/_{10000}$ $FeCl_3$ ccm	Ninhydrin 1% ccm	H_2O	Reaktion (70 Sek. Erhitzungsdauer)	Bemerkungen
1	4,0	0,8	0,2	ad 10,2	Während des Erhitzens gelblich, nach 30 Min. gelb	Bei der Subtilität der Versuche ist es schwer, alle Bedingungen so zu treffen, daß vollständige Gleichheit des Farbentons und der Farbentiefe erreicht wird.
2	4,0	1,0	0,2	„ 10,2	desgl.	
3	4,0	1,2	0,2	„ 10,2	Während des Kochens ?, nach 30 Min. rötlich	
4	4,0	1,4	0,2	„ 10,2	Während des Kochens ?, nach 30 Min. rötlich, aber mehr violett	
5	4,0	1,6	0,2	„ 10,2	Während des Kochens ?, nach 30 Min. bräunlichrot	
6	4,0	1,8	0,2	„ 10,2	Während des Kochens ?, nach 30 Min. bräunlichviolett	
7	4,0	2,0	0,2	„ 10,2	Während des Kochens ?, nach 30 Min. rotviolett	

Versuch 9c.

Die 16 Proben der Versuche 9a und 9b werden nun mit je 1 Tropfen $^{n}/_{10}$-Essigsäure versetzt und umgeschüttelt. Sämtliche gelben Proben färben sich momentan violett, und die violetten Proben nehmen eine blauviolette Färbung an. $FeCl_3$ enthält Ferrum oxychloratum.

Versuch 10.

Nr.	$^{n}/_{100}$-$(NH_4)_2CO_3$ ccm	$^{n}/_{10000}$ $Fe^{\cdot\cdot}SO_4$ ccm	$^{n}/_{10000}$ $Fe^{\cdot\cdot\cdot}Cl_3$ ccm	Ninhydrin 1% ccm	H_2O	Reaktion (70 Sek. Erhitzungsdauer)
1	3,0	1,0		0,2	ad 10,2	Während des Erhitzens —, nach 30 Min. gelb, dazu 2 Tr. $^{n}/_{10}$-Essigsäure violett
2	3,0	2,0		0,2	„ 10,2	Während des Erhitzens —, nach 30 Min. gelb, dazu 2 Tr. $^{n}/_{10}$-Essigsäure farblos
3	3,0	3,0		0,2	„ 10,2	Während des Erhitzens ?, nach 30 Min. farblos, dazu 2 Tr. $^{n}/_{10}$-Essigsäure farblos
4	3,0	4,0		0,2	„ 10,2	Während des Erhitzens rötlich, nach 30 Min. eben violett, dazu 2 Tr. $^{n}/_{10}$-Essigsäure blauviolett
5	3,0		1,0	0,2	„ 10,2	Während des Erhitzens gefärbt ?, nach 30 Min. bräunlich, dazu 2 Tr. $^{n}/_{10}$-Essigsäure farblos
6	3,0		2,0	0,2	„ 10,2	—, nach 30 Min. violett wie Nr. 4, mit 2 Tr. $^{n}/_{10}$-Essigsäure blauviolett
7	3,0		3,0	0,2	„ 10,2	—, nach 30 Min. stärker violett als Nr. 6, mit 2 Tr. $^{n}/_{10}$-Essigsäure blauviolett
8	3,0		4,0	0,2	„ 10,2	—, nach 30 Min. stärker violett als Nr. 7, mit 2 Tr. $^{n}/_{10}$-Essigsäure blauviolett

Nach Zusatz der Essigsäure bleibt das Verhältnis der Farbenintensitäten $4 = 6 < 7 < 8$ erhalten.

Ob $Fe^{\cdot\cdot}$ anders wirkt als $Fe^{\cdot\cdot\cdot}$, ist durch diese Versuche nicht zu entscheiden.

Versuch 12.

Nummer	$^{n}/_{100}$-$(NH_4)_2CO_3$ ccm	$^{n}/_{10}$-Glucose ccm	1% Ninhydrin ccm	H_2O	Reaktion: Erhitzungsdauer 70 Sek.	Nach 10 Min.	Nach 30 Min.	Nach 30 Min. Zusatz von 1 Tropfen $^{n}/_{10}$-Essigsäure
1	4,0	4,0	0,2	ad 10,2	Nach ca. 50 Sek. rötlich	blauviol.	blauviol.	blauviolett
2	4,0	3,0	0,2	„ 10,2	„ „ 60 „ „	„	„	„
3	4,0	2,0	0,2	„ 10,2	„ „ 65 „ „	„	„	„
4	4,0	1,0	0,2	„ 10,2	„ „ 85 „ „	„	ganz schw. braunviol.	„
5	4,0	4,0	0,2	„ 10,2	„ „ 50 „ „	„	blauviol.	„
6	3,0	4,0	0,2	„ 10,2	„ „ 50 „ „	„	„	„
7	2,0	4,0	0,2	„ 10,2	„ „ 60 „ „	„	„	unverändert
8	1,0	4,0	0,2	„ 10,2	„ „ 80 „ schw. bräunlich-rötlich	„	farblos	farblos
9	4,0	4,0	0,4	„ 10,2	Nach ca. 60 Sek. rötlich	„	blauviol.	blauviolett
10	4,0	4,0	0,8	„ 10,2	„ „ 35 „ „	„	„	„

Intensität der Färbung nach 30 Minuten: $10 > 9 > 1 = 2 = 3 = 5 > 6 > 7 > 4 > 8$.

Intensität der Färbung nach 30 Minuten: Nr. 4 + 1 Tropfen $^{n}/_{10}$-Essigsäure = Nr. 7 ohne Essigsäure; Nr. 7 + 1 Tropfen Essigsäure unverändert.

Versuch 11.

Versuche mit Glucose an Stelle von Fe.

Nr.	n/100-$(NH_4)_2CO_3$ ccm	n/10-Glucose ccm	1% Ninhydrin ccm	H_2O	Reaktion: Erhitzungsdauer 70 Sek. Erhitzungsbeginn 0 „	Nach 30 Minuten Luftkühlung	Nach Zusatz von 1 bis 3 Tropfen n/10-Essigsäure
1	4,0	4,0	0,2	ad 10,2	Nach ca. 45 Sek. rot } in abnehmender Stärke	blauviolett } in abnehmender Stärke	unverändert
2	4,0	3,0	0,2	„ 10,2	„ „ 60 „ „	„	„
3	4,0	2,0	0,2	„ 10,2	„ „ 90 „ „	rötlichviolett	blauviolett
4	4,0	1,0	0,2	„ 10,2	Noch später rot	rötlich braun nach violett	„
5	3,0	3,0	0,2	„ 10,2	Nach ca. 60 Sek. rotviolett	blauviolett	
6	3,0	2,0	0,2	„ 10,2	„ „ 90 „ rötlich	typisch blauviolett	
7	3,0	1,0	0,2	„ 10,2	„ „ 80 „ „	bräunlich violett	
8	2,0	2,0	0,2	„ 10,2	„ „ 60 „ „	blauviolett	
9	2,0	1,0	0,2	„ 10,2	„ „ 60 „ schwach bräunlich-rötlich	farblos	rotviolett
10	1,0	1,0	0,2	„ 10,2	Nach ca. 60 Sek. vorübergehend bräunlich	„	farblos
11	1,0	9,0 n/100-Gl.	0,2	—	do.	„	} unverändert
12	1,0	7,0 „	0,2	„ 10,2	do.	„	
13	1,0	5,0 „	0,2	„ 10,2	farblos	„	
14	1,0	3,0 „	0,2	„ 10,2	„	„	
15	1,0	1,0 „	0,2	„ 10,2	„	schwach gelb	

II. Nachtrag zur Organbereitung.

Nach Abschluß meiner experimentellen Untersuchungen[1]) ist eine Mitteilung Abderhaldens[2]) erschienen, die wiederum eine, und zwar einschneidende, Veränderung der Methodik durch Einführung vollkommen entfetteter, feuchter Organe und trockner Organpulver, sowie durch Benutzung der Methoden von van Slyke und Hirsch gebracht hat. Zum Zwecke der Entettung werden die Organe mit Alkohol, Aceton usw. behandelt Über die Anwendung derartiger eiweißkoagulierender Agenzien schreibt Abderhalden[3]) noch im April 1914: „Hervorgehoben sei noch, daß die Substrate mit keinen Desinfizienzien — Alkohol, Sublimat, Lysol usw. — in Berührung gekommen sein dürfen. Diese Agenzien verändern die Eiweißstoffe immer mehr oder weniger und machen sie für Fermente schwer oder ganz unangreifbar.“ Bereits am 5. XI. 1914 empfiehlt Abderhalden[2]) hingegen die entfetteten Organe: „Die letzteren sind schon seit ca. einem Jahre in Gebrauch und haben gute Resultate ergeben.“ Das von seiten Abderhaldens unwidersprochen gebliebene Eingeständnis Paquins[4]), daß die bis dahin benutzten Organe die Eigenschaften nicht durchaus besitzen, die sie besitzen müssen, führt bei ihrer Anwendung unweigerlich zu den Konsequenzen, die den leitenden Gesichtspunkt meiner bisherigen Darlegungen bilden. Sind andererseits die Untersuchungsergebnisse richtig, die mit den nach dem neuen Verfahren dargestellten Organen gewonnen wurden, so ist die von Abderhalden gegebene Erklärung für die früheren Mißerfolge unrichtig und läßt nur den Schluß zu, daß in diesen Fällen ein Abbau vermißt wurde, obwohl er gemäß der Abderhaldenschen Lehre hätte eintreten müssen. Ein Anlaß, Abder halden auf diesem neuen Wege weiter zu folgen, besteht für mich auch jetzt nicht. Denn, ist die Lehre Abderhaldens richtig, so muß der Beweis eventuell bei Anwendung beliebig großer Serum- und Organmengen sich allein mit der Biuretreaktion führen lassen, sobald Abderhalden ein sinngemäßes,

---

[1]) cf. Anm. S. 1.
[2]) Fermentforschung 1, 1, 20.
[3]) Abwehrfermente, 4. Aufl., S. 247.
[4]) Fermentforschung 1, 1, 59.

objektives, quantitatives Verfahren zur Bestimmung der Hülsendurchlässigkeit anwendet. Machen dagegen nur quantitative Unterschiede das Wesen seiner Reaktion aus, so sind zunächst alle diejenigen Forderungen zu erfüllen, die als unerläßlich durch den bisherigen Gang der Untersuchung begründet wurden. Da aber weiter die einzelnen Untersuchungsmethoden, mit denen Abderhalden gleichzeitig dieselben Resultate wie mit der interferometrischen Methode erhalten zu haben angibt, ihrem Wesen nach ganz verschiedene Ziele verfolgen und in ihren Ergebnissen sich nur streckenweise decken können, wenn die Versuchsbedingungen andere sind als beim interferometrischen Verfahren, so müssen ausnahmslos diejenigen Bedingungen auch erfüllt sein, welche die Anwendung der interferometrischen Methode[1]) verlangt. Da indessen Hirsch selbst ausdrücklich angibt, daß die Darstellungsweise der Placenta, die Abderhalden auf andere Organe angewendet hat, sich auf andere Organe nicht übertragen lasse, sondern daß jedes Organ eine andere Zubereitung erfordere, ihre Bewertung aber, wie Hirschs Methode der „Standardisierung“ von Placenta zeigt, wiederum die Anwendung der nachweislich ungenügend aufgeklärten und demnach zuvor erst noch aufzuklärenden Ninhydrinreaktion voraussetzt, so erscheint es, ganz abgesehen davon, daß die interferometrische Methode ein ganz anderes Ziel verfolgt als dasjenige ist, das den Wesenskern der Abderhaldenschen Lehre ursprünglich bildete, vollständig aussichtslos, auf diesem Wege zu einer weiteren Erkenntnis zu gelangen. Abderhaldens Beweisführung bewegt sich nach wie vor in demselben Kreise. Er setzt das Beweisziel als bewiesene Tatsache voraus und kehrt vermittels neuer, daraus sich ableitender Hilfshypothesen zu seinem Ausgangspunkt naturgemäß zurück.

Für die Beurteilung der praktischen Erfolge[2]) als Beweis für die Richtigkeit der Abderhaldenschen Lehre ist damit zugleich ein weiterer, fester Standpunkt gewonnen. Die „scheinbar“ nicht spezifischen Reaktionen, die Tatsache, daß Krebs von Schwangerenserum und Placenta von Krebsserum abgebaut wird, was ja in Abderhaldens Forderungen der Organprüfung deutlich zum Ausdruck kommt, ferner die im Einzelfall ob-

[1]) Fermentforschung 1, 1, 33.

[2]) cf. S. 71.

jektiv niemals zu begründende Deutung der farblosen, gelben, roten usw. Ninhydrinproben als negative Reaktionen bedeuten, um nur das Wichtigste anzuführen, ebensoviele Ausnahmen (bzw. unverwertbare Fälle) von der Regel, daß Theorie und Praxis Hand in Hand gingen. Nimmt man hinzu, daß die Richtung, die der Versuch einzuschlagen hat, im Gegensatz zu einer chemischen Analyse von vornherein eng umgrenzt und daher bekannt sein muß, daß richtige Ergebnisse zum Teil erst „nachträglich“[1]) erzielt und außerdem zahlreiche Mittel (z. B. Organ-, Serummenge, Versuchsdauer usw.) aufgedeckt wurden, die den Ausfall bzw. die Deutung der Versuche in unkontrollierbarer Weise und, worauf nochmals ganz ausdrücklich hingewiesen sei, auch bei aufrichtigstem Streben nach Objektivität unbeabsichtigt, weil unerkannt, beeinflussen können, so wird man diesem, auch durchaus nicht als zutreffend anerkannten Argument keinerlei Bedeutung beimessen und nach Aufdeckung der eigentlichen Fehlerquelle verstehen können, warum Abderhaldens Lehre begeisterte Aufnahme und entschiedenste Ablehnung gleichzeitig gefunden hat.

Es sei daher zum Schluß noch besonders hervorgehoben, daß auch der Verfasser die Lehre Abderhaldens ursprünglich für durchaus begründet hielt, bis Unstimmigkeiten, die im Versuch sich alsbald ergaben, die Untersuchung in eine Richtung drängten, die der erwarteten diametral entgegengesetzt verlief. Den objektiven Beweis für die Richtigkeit dieser Behauptung bildet die gegebene Darstellung der Abderhaldenschen Lehre selbst. Denn es bedarf wohl keiner weiteren Begründung, daß die ebenso mühselige wie unbefriedigende Durchführung dieser Untersuchung unterblieben wäre, wenn das Ergebnis der kritischen Behandlung der Lehre Abderhaldens, die ich als ersten Abschnitt lediglich im Interesse einer klareren Darstellung dem experimentellen Teil vorangestellt habe, in seinen letzten Zusammenhängen vor Inangriffnahme des experimentellen Teils vollständig klar erkannt worden wäre.

Herrn Prof. May, der meine Arbeit durch Rat und Tat in jeder nur denkbaren Weise förderte, bitte ich, auch an dieser Stelle meinen wärmsten Dank entgegennehmen zu wollen.

---

[1]) Münch. med. Wochenschr. 1918, 2775.

Übersicht.

Den Brennpunkt der Abderhaldenschen Lehre von den spezifischen Abwehrfermenten bildet die bestrittene, „spezifische“ Schwangerschaftsreaktion, deren Spezifizität an den positiven Beweis geknüpft ist, daß die mit ihrer Existenz unvereinbaren Ausnahmen Versuchsfehler und nur „scheinbar“ nicht spezifische, in Wirklichkeit aber spezifische Reaktionen darstellen. Abderhaldens Versuche, welche die Spezifizität dieser „scheinbar“ nicht spezifischen Reaktionen beweisen sollen, setzen die Spezifizität der Schwangerschaftsreaktion als bewiesene Tatsache voraus. Die spezifische Schwangerschaftsreaktion ist eine Hypothese. Abderhaldens Lehre und Methodik bilden eine untrennbare Einheit. Wurde letztere folgerichtig entwickelt, so müssen sich die Folgerungen, die sich ergeben, wenn man Abderhaldens Hypothese als richtig voraussetzt, im Versuche verwirklichen lassen. Experimentelle Fassung des Problems: „Das spezifische Schwangerschaftsferment baut das spezifische Substrat der Placenta über ein kolloidales Zwischenstadium zu Polypeptiden und Aminosäuren ab“. Von den verschiedenen, zur Charakterisierung der Spaltprodukte dienenden Methoden kommen nur das Dialysierverfahren in Verbindung mit Biuretreaktion und Ninhydrinprobe und die optische Methode in Betracht, die gleichzeitig angewandt werden müssen.

I. Das Dyalisierverfahren.

Die Biuretreaktion ist eine qualitative Reaktion auf Polypeptide, die Ninhydrinprobe u. a. ein Reagens auf die relative oder absolute Konzentration der α-Aminocarboxylgruppe S. 217—219

Trotz dieser Unterschiede in der Anwendungsart und im Geltungsbereich beider Reaktionen hat Abderhalden die Biuretreaktion durch die Ninhydrinprobe vollwertig ersetzt, was nur unter bestimmten, hypothetischen Voraussetzungen zulässig ist. Daraus ergeben sich innere Widersprüche und die hypothetische Grundlage des Dialysierverfahrens . . . S. 219—222

Die Behauptung Abderhaldens, daß beide Reaktionen in ihren Ergebnissen sich decken, ist unbewiesen, weil die

Gewinnung von Phytase aus Malz.

Von

Ludwig Adler.

(Aus dem Laboratorium zur Förderung des Braugewerbes an der Kgl. Akademie Weihenstephan.)

(Eingegangen am 9. April 1916.)

Die Anwesenheit von Phytase im Malz wurde vom Verfasser bereits vor Jahren nachgewiesen. Schon in der Arbeit[1]) „Über organisch und anorganisch gebundene Phosphorsäure im Bier und ihre Beziehung zu Gerste und Malz" konnten wir zeigen, daß im Malz Enzyme vorhanden sind, die organische Phosphatverbindungen in ihre Komponenten zu zerlegen vermögen. Da damals gleichzeitig die Anwesenheit von Phytin in Gerste und Malz bemerkt wurde, worauf auch schon K. Geys[2]) aufmerksam machte, und dieses Phytin nur bei Extraktionen mit enzymtötenden Mitteln gewonnen werden konnte, lag die Vermutung nahe, daß unter jenen Enzymen die Phytase eine Rolle spielt. Durch eine spätere Untersuchung[3]) „Über die Phosphatasen im Malz" fanden wir unsere Ansicht vollauf bestätigt. Es zeigte sich nämlich, daß ein frisch bereiteter Malzauszug imstande ist, bei Einhaltung entsprechender Bedingungen aus Phytin anorganische Phosphate in beträchtlicher Menge abzuspalten. Damit war das Vorhandensein von Phytase im Malz erwiesen.

Vorliegende Arbeit stellte sich nun die Aufgabe, aus dem

---

[1]) L. Adler, Zeitschr. f. d. ges. Brauwes. **35**, 181, 1912.

[2]) K. Geys, Beiträge zur chemischen Kenntnis der Gerstenspelzen. Dissertation, München 1910.

[3]) L. Adler, diese Zeitschr. **70**, 1, 1915.

Malz die Phytase zu isolieren. Die Wege, die wir zur Erreichung unseres Zieles einschlagen konnten, waren größtenteils vorgezeigt durch die grundlegenden Studien C. J. Lintners[1] über die Diastase und ihre Reindarstellung. Es bieten sich hauptsächlich zwei Möglichkeiten, um wirksame Enzyme aus Malzauszügen zu gewinnen: erstens eine Fällung mit starkem Alkohol und zweitens die Anwendung eines geeigneten Salzes, wodurch die Enzyme niedergeschlagen werden. Beide Methoden wurden von uns angewendet; mit welchem Erfolg, werden wir im folgenden kennen lernen. Im einzelnen hielten wir uns ziemlich genau an die Angaben C. J. Lintners, die sich mit kleinen Änderungen auch für unsere Zwecke, bei denen es sich ja nicht um die Darstellung von Diastase, sondern vielmehr von Phytase handelte, sehr gut bewährten.

Schon U. Suzuki, K. Joshimura und M. Takaishi[2]) behaupten, Phytase aus Reiskleie rein dargestellt zu haben. Abgesehen davon, daß ihre Arbeitsweise aus der Beschreibung nicht vollkommen klar ersichtlich wird, läuft ihre Methode letzten Endes gleichfalls auf eine Ausscheidung der Enzyme durch Alkohol hinaus.

Methode zur Bestimmung von anorganischer Phosphorsäure bei Anwesenheit von Phytin.

Bevor wir unsere Untersuchung in Angriff nahmen, mußten wir uns eine Methode zurechtlegen, die es ermöglicht, anorganische Phosphate neben Phytin zu ermitteln. Schon bei unserer letzten, oben erwähnten, Arbeit hatten wir uns mit der Lösung dieser Frage beschäftigt. Dort kam es uns in erster Linie nur darauf an, vergleichbare Resultate zu erzielen, während wir jetzt einer vollkommen zuverlässigen Methode bedürfen, um durch die quantitative Bestimmung der aus dem Phytin entstandenen anorganischen Phosphate ein Urteil über die Stärke der enzymatischen Kraft des jeweiligen phytasehaltigen Präparates gewinnen zu können. Zu diesem Zweck wurden Studien

---

[1]) C. J. Lintner, Journ. f. prakt. Chem. Neue Folge. 34, 378; 36, 481, 1886/87. Zeitschr. f. d. ges. Brauw. 9, 474, 1886; 11, 77, 1888; 25, 365, 1902.

[2]) U. Suzuki, K. Joshimura und M. Takaishi, Bull. of the Coll. of Agric. Tokyo 7, 504, 1907.

durchgeführt einerseits über die zur gänzlichen Abscheidung der anorganischen Phosphorsäure mittels Molybdänlösung notwendigen Temperaturen, andererseits über die Zersetzlichkeit des Phytins durch Säuren in einer Konzentration, wie sie bei der Bestimmung der Phosphorsäure nach N. v. Lorenz[1]) in der Lösung vorhanden sein muß. Diese Methode legten wir auch hier allen Untersuchungen zugrunde.

Wir bereiteten uns eine entsprechend verdünnte Phosphatlösung aus reinstem sek. Kaliumphosphat, pipettierten davon je 30 ccm in Bechergläser, setzten dazu je 20 ccm der nach v. Lorenz bereiteten Salpeter-Schwefelsäurelösung und fällten mit der vorschriftsmäßigen Ammoniummolybdatlösung unter wechselnden Bedingungen die Phosphorsäure aus. Die Filtration, das Trocknen und Wägen der erhaltenen Niederschläge wurde genau nach den Angaben von v. Lorenz durchgeführt. Die unten angeführten Untersuchungsergebnisse stellen die Mittelwerte aus je zwei Analysen vor.

a) Die Phosphatlösung bis zum Erscheinen der ersten Kochblase erhitzt und dann mit der Molybdänlösung versetzt.

Dabei ergab sich 19,81 mg P_2O_5.

b) Die Phosphatlösung auf 50° erwärmt und dann mit der Molybdänlösung versetzt.

Dabei ergab sich 19,80 mg P_2O_5.

c) Die Phosphatlösung auf 50° erwärmt und dann mit der auf 50° vorgewärmten Molybdänlösung versetzt.

Dabei ergab sich 19,88 mg P_2O_5.

d) Die Phosphatlösung bei Zimmertemperatur mit der Molybdänlösung versetzt.

Dabei ergab sich 19,63 mg P_2O_5.

Durch diese Versuche zeigte sich, daß ein Erhitzen der zu untersuchenden Phosphatlösung auf Kochtemperatur vor der Fällung mit dem Molybdänreagens nicht unbedingt nötig ist. Schon ein vorheriges Anwärmen auf 50° tut die gleichen Dienste. Selbst in der Kälte scheint die Phosphatabscheidung fast vollkommen zu sein, d. h. es fällt ein gleich zusammengesetzter Niederschlag in fast der gleichen Menge aus wie bei der nach Vorschrift zuvor erhitzten Lösung. Als ein kleiner Übelstand

---

[1]) N. v. Lorenz, Landwirtschaftl. Versuchsstat. **55**, 183, 1901.

machte sich nur der Umstand bemerkbar, daß bei den Fällungen, die bei 50° bzw. bei Zimmertemperatur durchgeführt wurden, sich etwas mehr Niederschlag an die Glaswandungen der Bechergläser anlegte als bei den aufgekochten Proben. Doch ließ sich durch Gummiwischer der Niederschlag leicht wieder ablösen.

Über den Einfluß des Lorenzschen Säuregemisches auf Phytin führten wir folgende Untersuchungen aus. Zu diesen und allen späteren Analysen kam das gleiche käufliche Phytin zur Anwendung. Es war dies ein Präparat, das uns die Gesellschaft für chemische Industrie in Basel liebenswürdigerweise zur Verfügung gestellt hatte.

Dieses Phytin lieferte bei der Veraschung 39,47% an Gesamtphosphorsäure.

Wir versetzten nun mehrere Proben von je 0,2 g unseres Phytins mit je 20 ccm der schwefelsäurehaltigen Salpetersäure und gaben dazu je 30 ccm Wasser, wie für die Lorenzbestimmung vorgeschrieben ist. Diese Säurelösung ließen wir verschiedene Zeiten lang und bei verschiedenen Temperaturen auf das Phytin einwirken. Die Mittelwerte aus den gewonnenen Ergebnissen sind hier zusammengestellt.

a) Die Phytinlösung auf 50° erwärmt und dann mit der Molybdänlösung versetzt.

Dabei ergab sich 3,26 mg P_2O_5 = 4,13% fällbare P_2O_5 auf Gesamtphosphorsäure berechnet.

b) Die Phytinlösung 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann auf 50° erwärmt und mit der Molybdänlösung versetzt.

Dabei ergab sich 3,20 mg P_2O_5 = 4,17% fällbare P_2O_5 auf Gesamtphosphorsäure berechnet.

c) Die Phytinlösung 1½ Stunden auf 50° erwärmt und dann mit der Molybdänlösung versetzt.

Dabei ergab sich 3,42 mg P_2O_5 = 4,33% fällbare P_2O_5 auf Gesamtphosphorsäure berechnet.

d) Die Phytinlösung auf 50° erwärmt und dann mit der Molybdänlösung versetzt, die auf 50° vorgewärmt war.

Dabei ergab sich 3,34 mg P_2O_5 = 4,23% fällbare P_2O_5 auf Gesamtphosphorsäure berechnet.

e) Die Phytinlösung bis zum Erscheinen der ersten Kochblase erhitzt und dann mit der Molybdänlösung versetzt.

Dabei ergab sich 3,74 mg P_2O_5 = 4,74 % fällbare P_2O_5 auf Gesamtphosphorsäure berechnet.

f) Die Phytinlösung $1^1/_2$ Stunden zum Kochen erhitzt (102°) und dann mit der Molybdänlösung versetzt.

Dabei ergab sich 8,90 mg P_2O_5 = 11,28 % fällbare P_2O_5 auf Gesamtphosphorsäure berechnet.

Man ersieht aus den Versuchen (a bis d), daß das Lorenzsche Säuregemisch das Phytin weder bei dreitägigem Einwirken in der Kälte, noch bei $1^1/_2$-stündigem Erwärmen auf 50° anzugreifen vermag. Die kleinen Schwankungen obiger Werte liegen innerhalb der Grenze der unvermeidlichen Versuchsfehler. So ergab sich bei vier gleichartigen Analysen, die wie Versuch a durchgeführt wurden, ein größter Unterschied zwischen den erhaltenen Werten von 0,19 % fällbare Phosphorsäure auf Gesamtphosphorsäure berechnet.

Aus Versuch e können wir erkennen, daß schon ein ganz kurzes Erhitzen der sauren Phytinlösung zersetzend wirkt. Hier kann nicht eingewendet werden, daß durch die bei der Fällung mit Molybdänlösung vorhandene höhere Temperatur, wie sie auch ursprünglich von v. Lorenz verlangt wird, eine vollständigere Abscheidung der anorganischen Phosphate und dadurch eine Vermehrung des Wertes für fällbare Phosphorsäure stattgefunden hat; denn wie die vorherigen Untersuchungen mit reiner Phosphatlösung erwiesen haben, wird schon bei 50° alle anorganische Phosphorsäure quantitativ mit Molybdänlösung ausgefällt. Daß wirklich sich beim Erhitzen auf 100° schon eine deutliche Spaltung des Phytins bemerkbar macht, offenbart sich des weiteren aus Versuch f. Durch die Kochdauer von $1^1/_2$ Stunden wurde die durch Molybdänlösung fällbare Phosphorsäure bereits um den doppelten Wert des ursprünglichen Betrages erhöht. Bei der Bestimmung der anorganischen Phosphorsäure neben Phytin dürfen deshalb Temperaturen über 50° nicht angewendet werden.

Schließlich wollten wir noch den Einfluß untersuchen, den die Anwesenheit von Phytin auf die Fällung der anorganischen Phosphate ausübt und dabei beobachten, ob etwa das Phytin

anorganische Phosphate zurückzuhalten vermag. Zu diesem Zweck versetzten wir eine Auflösung von 0,1 g Phytin in 20 ccm Salpetersäure mit 30 ccm obiger reiner Kaliumphosphatlösung. Wir fällten dann bei 50° mit der Molybdänlösung.

Dabei ergab sich . . . . 21,39 mg P_2O_5.
Wie vorher gezeigt, stammen aus dem Phytin selbst 1,63 „ fällbare P_2O_5.
Demnach treffen auf die 30 ccm Phosphatlösung 19,76 mg P_2O_5.
Die Analyse lieferte für die 30 ccm Phosphatlösung allein . . . . 19,80 „ P_2O_5.

Wir finden also eine glänzende Übereinstimmung der beiden Werte. Durch das Phytin wurde auch nicht eine Spur des zugesetzten Phosphates zurückgehalten. Andererseits kann auch kein Phytin durch den entstandenen Niederschlag mit niedergerissen worden sein, wenigstens nicht in einer solchen Menge, daß sie bei der Wägung ins Gewicht gefallen wäre.

Da Wo. Heubner[1]) die Behauptung aufstellt, daß besonders große Mengen an Phytin die Fällung der anorganischen Phosphorsäure stören können, führten wir eine Analyse mit 0,5 g Phytin durch, das wir in der entsprechenden Menge Salpeter-Schwefelsäure und Wasser zu einem Gesamtvolumen von 50 ccm lösten. In dieser Flüssigkeit befindet sich bei einem äußerst kleinen Gehalt an anorganischer Phosphorsäure eine bedeutende Menge von Phytin. Die Fällung wurde bei 50° mit der Molybdänlösung vorgenommen.

Dabei ergab sich 8,20 mg P_2O_5 = 4,16% fällbare P_2O_5 auf Gesamtphosphorsäure berechnet.

Bei der gleichen Versuchsanordnung nur unter Verwendung von 0,1 g Phytin ergab sich 1,69 mg P_2O_5 = 4,28% fällbare P_2O_5 auf Gesamtphosphorsäure berechnet.

Selbst durch die Anwesenheit von so großen Mengen Phytin wurde nach obiger Arbeitsweise die Bestimmung der anorganischen Phosphorsäure keineswegs beeinträchtigt. Wir wollen dahingestellt sein lassen, ob ein Vorhandensein von noch mehr Phytin bei der Analyse hindernd wirken kann; für unsere und wohl auch für die meisten anderen Fälle kommt eine solche Möglichkeit kaum in Betracht und braucht deshalb hier nicht

---

[1]) Wo. Heubner, diese Zeitschr. 64, 401, 1914.

berücksichtigt zu werden. Jedenfalls haben wir kennen gelernt, daß sowohl bei Gegenwart von viel anorganischer Phosphorsäure neben wenig Phytin als auch umgekehrt bei Anwesenheit von viel Phytin neben wenig anorganischer Phosphorsäure unsere Methode einwandfreie Werte liefert.

Auf Grund dieser Versuche steht uns nun eine einfache und genaue Methode zur Bestimmung von anorganischer Phosphorsäure bei Anwesenheit von Phytin zur Verfügung: Man verdünnt 2 Teile der von v. Lorenz vorgeschriebenen Salpeter-Schwefelsäuremischung mit 3 Teilen Wasser. Mit dieser verdünnten Säure löst man die zu analysierende Substanz zu einem Gesamtvolumen von 50 ccm auf. Dann erwärmt man auf 50° und fällt mit der Ammoniummolybdänlösung. Sobald sich der entstandene Niederschlag vollkommen abgesetzt hat, was oft schon nach wenigen Stunden der Fall ist, kann man filtrieren. Die weitere Behandlung geschieht genau nach den Angaben von v. Lorenz.

Da nach dieser Arbeitsweise, wie durch obige Analysen bewiesen wurde, nur die anorganische Phosphorsäure zur Wägung gebracht wird, während das gleichzeitig vorhandene Phytin nicht im geringsten angegriffen wird, ergibt sich von selbst die Tatsache, daß der aus unserem käuflichen Phytin nach der angeführten Methode mit Molybdänlösung fällbare Teil nur anorganische Phosphorsäure sein kann, die von vornherein dem Phytin beigemengt war. Auch kann die zersetzende Wirkung von Säuren auf Phytin entgegen der Ansicht vieler Forscher keineswegs als sehr stark bezeichnet werden, eine Vermutung, die wir schon anläßlich unserer früheren Untersuchungen ausgesprochen haben.

Gewinnung von Phytase.

I. Durch Fällung mit Alkohol.

Zur Extraktion gelangte ein Grünmalz, wie es in Brennereien benutzt wird. Die verwendete kleinkörnige Gerste enthielt viel Protein. Aus diesen Gersten werden bekanntlich meist die enzymreichsten Malze gewonnen. Das Wachstum der Gerste wurde auf 14 Tage ausgedehnt, um die Enzyme möglichst vollkommen zur Entwicklung zu bringen. Das fertige Grünmalz

zerkleinerte man gründlichst in einer besonderen Grünmalzquetschmühle. Von dem so vorbereiteten feuchten Grünmalz wurden 700 g unter ständigem mechanischem Rühren 7 Stunden lang bei Zimmertemperatur mit 2,5 l 25 $^{0}/_{0}$igem Alkohol extrahiert. Darauf trennte man die festen Teile durch Auspressen von der Flüssigkeit. Diese filtrierte man noch über mehrere Faltenfilter, um sie von der aufgeschlemmten Stärke zu befreien. Die Filtration dauerte allerdings etwa 14 Stunden; doch trat dabei durch den Alkoholgehalt kein Verderben der Lösung ein. Wir erhielten so ungefähr 1900 ccm Flüssigkeit.

Zur Ausfällung der Enzyme setzten wir nun das $3^{1}/_{2}$fache Volumen an 96 $^{0}/_{0}$igem Alkohol hinzu und ließen in hohen Standzylindern den entstandenen flockigen Niederschlag sich gut absetzen, was in etwa 3 Stunden der Fall war. Die überstehende Flüssigkeit wurde abgehebert und der Niederschlag auf einem glatten Filter gesammelt. Die Filtration ging gut vonstatten und war in wenigen Stunden beendet. Der breiige Rückstand wurde nun vom Filter genommen, in einer Reibschale mit absolutem Alkohol verrieben und neuerdings filtriert. Eine wesentliche Beschleunigung des Verfahrens konnte dadurch erzielt werden, daß man zwecks Erniedrigung der hohen Viscosität des Alkohols Äther zusetzte. Die Flüssigkeit ließ sich dadurch in wenigen Sekunden durch Absaugen auf einer Nutsche vollkommen vom Niederschlag trennen. Das Verreiben des Rückstandes mit einem Gemisch von gleichen Teilen absolutem Alkohol und Äther verbunden mit einem kräftigen Absaugen und Auspressen auf der Nutsche wurde noch 2 mal wiederholt. Endlich wurde der Niederschlag noch ebenso oft in gleicher Weise nur mit Äther behandelt. Die so gereinigte und von Feuchtigkeit befreite Substanz ließ man 3 Tage über konzentrierter Schwefelsäure im Vakuum in einer flachen Glasschale noch vollkommen trocknen und breitete sie dann kurze Zeit an der Luft aus. Es wurden nach dieser Arbeitsweise etwa 6 g lufttrockene Substanz gewonnen.

In Aussehen und Verhalten entsprach das vorliegende Pulver genau der von C. J. Lintner[1]) beschriebenen Diastase, die ja auf fast gleiche Art erhalten worden war. Es gab in

[1]) l. c.

alkoholischer Lösung mit Guajac-Harz und Wasserstoffsuperoxyd eine starke Blaufärbung, die nicht eintrat, wenn die Substanz gekocht oder mit Salzsäure versetzt wurde. Nach längerem Stehen (4 Wochen) trat auffallenderweise die Guajac-Harz-Reaktion nur noch in wesentlich schwächerem Maße ein. Vielleicht verliert die Diastase überhaupt bei längerer Lagerung die Fähigkeit, mit dem Harz die Blaufärbung zu liefern, ohne daß aber dabei auch die diastatische Kraft wesentlich beeinträchtigt wäre. Dies kann mit ein Grund sein, warum verschiedene von uns geprüfte Handelsprodukte von Diastasen, wie z. B. das sicher aus Malz hergestellte Diastase-Maltin von der Firma C. A. F. Kahlbaum (Berlin), trotz ihrer kräftigen diastatischen Wirkung mit Guajac-Harz keine Reaktion zeigten.

1. Versuchsreihe.

Unser nach obiger Methode gewonnenes Präparat ließen wir nun auf Phytin einwirken. Daneben gelangte auch das käufliche Diastase-Maltin zur Verwendung, um zu studieren, ob etwa ein Phytin spaltendes Enzym darin vorhanden ist. Zu diesem Zweck wurden je 0,2 g Phytin in 4 tarierte Bechergläser genau abgewogen. Dazu wurden 30 ccm Wasser gegeben. Ein kleiner Teil des Phytins blieb dabei ungelöst. Diese Lösungen wiesen, wie ein Parallelversuch ergab, eine Wasserstoffionenkonzentration von $p_{H^\cdot} = 4{,}16$ auf. Aus unserer früheren Arbeit[1]) wissen wir, daß für die Tätigkeit der Malzphosphatasen, worunter wir ja auch, wenn nicht sogar hauptsächlich, die Phytase rechnen müssen, diese Wasserstoffionenkonzentration keineswegs günstig ist. Als Optimumswert fanden wir damals eine Wasserstoffionenkonzentration von $p_{H^\cdot} = 5{,}4$. Wir setzten deshalb obigen Phytinlösungen je 1,2 ccm einer $^n/_2$-Natronlauge hinzu. Dadurch trat allerdings eine kleine Trübung und eine schwache Ausfällung des Phytins ein.

Von unserem Phytasepulver verrieben wir 0,45 g in einer Reibschale mit wenig Wasser und ergänzten das Volumen dann auf 90 ccm. Der größte Teil ging dabei in Lösung. Die Flüssigkeit wies eine Wasserstoffionenkonzentration von $p_{H^\cdot} = 7{,}11$ auf, war also praktisch vollkommen neutral. Von dieser Lösung

[1]) l. c.

pipettierten wir je 30 ccm zu zwei der vorbereiteten Phytinproben, die sich in den Bechergläsern befanden. Die eine Probe wurde sofort erhitzt und 10 Minuten bei Kochtemperatur belassen. Ebenso verfuhren wir auch mit dem Diastase-Maltin, von dem wir 0,45 g unter gleichen Vorsichtsmaßregeln mit 90 ccm Wasser versetzten. Auch hier trat keine vollkommene Lösung ein. Je 30 ccm dieser Flüssigkeit gaben wir den noch übrigen beiden Phytinproben hinzu. Zwecks Enzymvernichtung wurde der eine Versuch 10 Minuten zum Sieden gebracht. Dann wurden alle vier Bechergläser mit einem Uhrglas bedeckt und in ein Wasserbad von 56° gestellt, da wir diese Temperatur früher als die der besten Wirksamkeit für die organische Phosphatkomplexe spaltenden Enzyme kennen gelernt hatten. Man ließ die Einwirkung bei der angegebenen Temperatur 6 Stunden vor sich gehen, wobei man öfters mit Glasstäbchen umrührte. Die beiden enzymkräftigen, noch nicht erhitzten Proben wurden jetzt gleichfalls 10 Minuten lang aufgekocht. Nach dem Abkühlen setzte man überall 2,0 ccm $^n/_2$-Salzsäure hinzu und ergänzte durch Aufwiegen mit Wasser die Flüssigkeitsmenge in den Bechern auf je 100 g. Dabei mußte auf das Gewicht der vorher zugegebenen festen Substanzen (Phytin, Enzyme, Natronlauge, Salzsäure) Rücksicht genommen werden. Durch den Zusatz der Salzsäure entstand in den Enzymversuchen eine Wasserstoffionenkonzentration von $p_{H^\cdot} = 2{,}96$ bzw. 2,87, so daß die damit verfolgte Absicht, das Phytin und besonders die ursprünglichen und etwa neu entstandenen anorganischen Erdalkaliphosphate vollständig in Lösung zu bringen, sicherlich erreicht wurde.

Von den filtrierten Proben wurden je 75 ccm abpipettiert. Darin fällten wir nach unserer schon des öfteren angewendeten Methode die anorganischen Phosphate, indem wir Ammoniak und Magnesiamixtur in der Kälte zusetzten. Natürlich fiel dadurch auch ein großer Teil des Phytins mit aus. Dabei zeigte sich, daß die ursprünglich nicht abgekochte, enzymkräftige Probe, die unser Phytasepräparat enthielt, als einzige mit Ammoniak allein schon einen deutlichen Niederschlag bildete, der sich nach Zugabe der Magnesiamixtur noch stark vermehrte. Auch war dieser Niederschlag im Verhältnis zu dem aus den anderen drei Proben wesentlich reichlicher, er setzte sich rascher und vollständiger ab und hatte bei weitem keine so schleimige

Beschaffenheit. Nach 14 Stunden wurden die Niederschläge filtriert, mit verdünnter Ammoniaklösung ausgewaschen und mit der im Verhältnis von 2:3 verdünnten Salpeter-Schwefelsäuremischung in der Kälte zu einem Volumen von je 50 ccm vom Filter gelöst. Durch Fällung bei 50° bestimmte man dann die Menge der vorhandenen anorganischen Phosphate.

a) Maltinversuch.

Die enzymkräftige Probe lieferte . .	2,61 mg P_2O_5 = 3,48 mg P_2O_5 für 0,2 g Phytin.
Die enzymvernichtete Probe lieferte	2,67 mg P_2O_5 = 3,56 mg P_2O_5 für 0,2 g Phytin.
Demnach durch Phytasewirkung entstanden	— —

b) Phytaseversuch.

Die enzymkräftige Probe lieferte .	29,85 mg P_2O_5 = 39,80 mg P_2O_5 für 0,2 g Phytin.
Die enzymvernichtete Probe lieferte	10,68 mg P_2O_5 = 14,24 mg P_2O_5 für 0,2 g Phytin.
Demnach durch Phytasewirkung entstanden . . .	19,17 mg P_2O_5 = 24,56 mg P_2O_5 für 0,2 g Phytin.

Durch unsere Phytase sind also 36,20% des Phytins gespalten worden.

Bei dieser und jeder folgenden Berechnung wurde berücksichtigt, daß das verwendete Phytin, wie oben gezeigt, 4,17% anorganische Phosphorsäure enthielt, so daß nicht die 39,47% Gesamtphosphorsäure des Phytins, sondern nur die 35,30% wirkliche Phytinphosphorsäure (organisch gebunden) in Betracht zu ziehen sind.

Das Maltin enthielt keine Phytase. Die kleine Abnahme der Phosphatwerte beim enzymkräftigen Versuch beruht natürlich auf unvermeidlichen Versuchsfehlern.

Durch Messung stellten wir fest, daß während des 6stündigen Einwirkungsprozesses der Enzyme auf das Phytin beim Maltin- bzw. beim Phytaseversuch eine Wasserstoffionenkonzentration von $p_{H^{\cdot}}$ = 6,45 bzw. 6,34 geherrscht hatte. Wir waren also vom Punkt der besten Wirksamkeit hier ziemlich weit entfernt gewesen.

2. Versuchsreihe.

Wir glaubten durch Verbesserung der Versuchsbedingungen noch eine weitergehende Spaltung des Phytins bewirken zu können. Zu diesem Zweck führten wir folgende Studien durch. Zu 5 Proben von je 0,2 g Phytin setzten wir 30 ccm Wasser und gaben dazu je 0,6 ccm $^{n}/_{2}$-Natronlauge. Von unserem Phytasepräparat lösten wir 0,9 g in 135 ccm Wasser nach tüchtigem Verreiben in einem Mörser. Von dieser Flüssigkeit pipettierte man 2 mal je 30 ccm in Bechergläser ab und verdünnte noch mit je 30 ccm Wasser. Die eine von diesen beiden Proben wurde sofort abgekocht, um die Enzymkräfte zu zerstören. Außerdem gab man je 30 ccm der gleichen Phytaselösung zu zwei der vorbereiteten Phytinproben. Vom Maltin verwendete man 1,0 g, die mit 75 ccm Wasser versetzt wurden. Je 30 ccm dieser Lösung pipettierte man ebenfalls zu zwei Phytinproben. Sowohl vom Phytase- wie vom Maltinversuch wurde zwecks Enzymvernichtung je eine Probe sofort zum Sieden erhitzt. Die noch übrigbleibende Phytinlösung wurde nur mit 30 ccm Wasser versetzt.

Alle Versuche, auch die enzymvernichteten (abgekochten), wurden nun 10 Stunden lang bedeckt in einem Wasserbad auf 56° erwärmt. Dabei rührte man öfters durch. Nach Ablauf der angegebenen Zeit wurden die noch nicht gekochten Proben ebenfalls zum Sieden gebracht. Dann kühlte man ab, setzte überall 1,0 ccm $^{n}/_{2}$-Salzsäure hinzu und ergänzte durch Aufwiegen mit Wasser die Flüssigkeitsmenge der einzelnen Versuche auf je 100 g. In je 75 ccm der Filtrate wurde wie vorher die Fällung mit Ammoniak und Magnesiamixtur vorgenommen. Auch hier unterschied sich unter den phytinhaltigen Proben der enzymkräftige Versuch, der mit unserer Phytase angestellt war, wesentlich von den übrigen, indem schon mit Ammoniak allein ein Niederschlag auftrat. Die mit Magnesiamixtur erhaltene Ausscheidung war entsprechend unserer früheren Wahrnehmung, die wir bei der 1. Versuchsreihe machten, reichlicher, weniger schleimig und setzte sich besser zu Boden. Dadurch offenbarte sich der größere Gehalt an anorganischen Phosphaten und die Abwesenheit von nennenswerten Mengen Phytin. Die weitere Behandlung der Niederschläge geschah wie vorher.

a) Phytin allein.

Das Phytin allein lieferte . . .	2,28 mg P_2O_5 =	3,04 mg P_2O_5 für 0,2 g Phytin.

b) Phytase allein.

Die enzymkräftige Probe lieferte .	9,69 mg P_2O_5 =	12,92 mg P_2O_5 für 0,2 g Phytase.
Die enzymvernichtete Probe lieferte	9,66 mg P_2O_5 =	12,88 mg P_2O_5 für 0,2 g Phytase.
Demnach durch Phytasewirkung entstanden . .	—	—

c) Maltinversuch.

Die enzymkräftige Probe lieferte .	2,76 mg P_2O_5 =	3,69 mg P_2O_5 für 0,2 g Phytin.
Die enzymvernichtete Probe lieferte	2,73 mg P_2O_5 =	3,64 mg P_2O_5 für 0,2 g Phytin.
Demnach durch Phytasewirkung entstanden . .	—	—

d) Phytaseversuch.

Die enzymkräftige Probe lieferte .	44,10 mg P_2O_5 =	58,80 mg P_2O_5 für 0,2 g Phytin.
Die enzymvernichtete Probe lieferte	12,90 mg P_2O_5 =	17,20 mg P_2O_5 für 0,2 g Phytin.
Demnach durch Phytasewirkung entstanden . .	31,20 mg P_2O_5 =	41,60 mg P_2O_5 für 0,2 g Phytin.

Durch unsere Phytase sind also 58,92 % des Phytins gespalten worden.

Neben der längeren Einwirkungsdauer und der größeren Enzymmenge, die hier 0,2 statt 0,15 g wie bei der 1. Versuchsreihe betrug, hat sicherlich auch die günstigere Wasserstoffionenkonzentration eine Rolle gespielt. Es ergab sich bei der Messung, daß während der Einwirkung der Phytase in der Lösung eine Konzentration an Wasserstoffionen von $p_H = 5,51$ vorhanden war. Wir hatten dadurch nun fast vollständig den gewünschten Optimumswert erreicht. Durch diese Umstände konnten wir die Phytasewirkung um mehr als die Hälfte des bei der 1. Versuchsanordnung erhaltenen Betrages steigern.

Unser Phytasepräparat enthält ziemlich viel anorganische

Phosphorsäure (etwa 6,5 %); jedoch finden sich darin keine organischen Phosphatkomplexe, wenigstens keine solchen, die durch das eigene Enzym zerlegt werden können, so daß unbedingt die ganze Zunahme an anorganischer Phosphorsäure beim enzymkräftigen Phytaseversuch gegenüber der entsprechenden enzymvernichteten Probe auf eine Phytinspaltung durch die Phytase zurückgeführt werden muß.

Die Phytinlösung allein lieferte bei der Analyse hier einen nur um eine Spur geringeren Betrag an anorganischer Phosphorsäure, wie bei der früheren direkten Fällung, wo wir 3,20 mg P_2O_5 für 0,2 g Phytin erhielten. Dieser Umstand findet keineswegs seinen Grund in der teilweisen Neutralisierung der Säure, worin man für das Phytin eine gegen Zersetzung schützende Wirkung erblicken könnte, sondern die Schuld wird wohl der umständlicheren Fällung mit Ammoniak und Magnesiamixtur zuzuschreiben sein, wodurch sich kleine Verluste oft nicht vermeiden lassen. Die Messung der Wasserstoffionenkonzentration der mit der angegebenen Menge Alkali versetzten Phytinlösungen lieferte einen Wert von $p_H = 5,43$.

Erwähnt sei auch die etwas auffallende Tatsache, daß die Summe der einzeln ermittelten Werte für anorganische Phosphorsäure von Phytin (selbst wenn man den früher erhaltenen höheren Wert zugrunde legt) und der zugesetzten Phytase, wobei sich 15,94 mg ergibt, um einen kleinen Betrag gegen den entsprechenden Wert der enzymvernichteten Phytaseprobe zurückbleibt. Dies beruht vielleicht darauf, daß schon während der kurzen Zeit, die bis zum Erhitzen der vermischten Lösungen naturnotwendig verstreichen muß, eine geringe Enzymtätigkeit vor sich gegangen ist. Dadurch würde sich der Wert für durch Phytasewirkung entstandene anorganische Phosphorsäure beim Phytaseversuch noch etwas erhöhen.

Die Diastase-Maltin hat auch hier trotz der günstigeren Bedingungen und der verwendeten doppelten Menge (0,4 g) keine Phytasewirkung auszuüben vermocht.

Die Stärke der Phytasetätigkeit kommt natürlich noch keineswegs an diejenigen Wirkungen heran, die wir bei der diastatischen Kraft gewohnt sind. Wir mußten gleiche Gewichtsmengen von Phytin und Phytase unter geeigneten Verhältnissen aufeinander einwirken lassen, um nur eine Spaltung von wenig

mehr als der Hälfte des Phytins zu erzielen. Doch ist zu berücksichtigen, daß unsere Substanz nur eine Rohphytase genannt werden kann. Die Hauptmenge bestand aus Proteinkörpern; daneben enthielt sie viel Asche, besonders Phosphorsäure. Von Enzymen wurden noch peptische und diastatische nachgewiesen.

Ein Urteil über den jeweiligen Grad der Phytinspaltung kann man auch dadurch gewinnen, daß man die Filtrate der Molybdänfällungen mit Ammoniak und Magnesiamixtur versetzt. Das nicht angegriffene Phytin fällt auf diese Weise in großen weißen Flocken aus, die sich zu Boden setzen. Sowohl bei der ersten wie besonders bei der zweiten Versuchsreihe war der so erhaltene Niederschlag bei den enzymkräftigen Phytaseversuchen wesentlich geringer als bei den enzymvernichteten Phytaseversuchen und den beiden Maltinproben.

II. Durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat.

Wir verwendeten auch zu dieser Gewinnungsmethode das gleiche, äußerst fein zerkleinerte Brennereigrünmalz, von dem wir 2,5 kg mit 4 l Wasser unter ständigem Rühren 6 Stunden lang bei Zimmertemperatur extrahierten. Durch Auspressen und Filtrieren der so gewonnenen Flüssigkeit über mehrere Faltenfilter konnte ein klarer Extrakt erhalten werden. Da die Filtration über 14 Stunden beanspruchte, arbeiteten wir in der Kälte bei etwa 6°. Ohne diese Vorsichtsmaßregel läßt sich eine Bakterienentwicklung nicht verhindern. Wir erhielten so 3,2 l eines bräunlich gefärbten Extraktes, dessen Gehalt 5,9° Balling betrug. Einen kleinen Teil dieser Lösung suchten wir nach der von C. J. Lintner angegebenen Vorschrift (l. c.) durch Ausfrierenlassen des Wassers zu konzentrieren. Zu diesem Zweck gaben wir die Flüssigkeit in einen dünnwandigen Blechtopf und stellten ihn in eine auf — 6° abgekühlte Salzlauge, wie sie uns in der Brauerei zur Verfügung stand. Unter kräftigem Rühren ließ sich die Bildung von zahlreichen losen Krystallen erzielen, die den ganzen Extrakt durchsetzten. Durch Filtration über ein engmaschiges Drahtnetz entfernte man die Eiskrystalle. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Auf diese Weise erhielten wir eine Lösung mit einer Konzentration von 9,4° Balling, wobei wir allerdings auch ziemliche Verluste mit in den Kauf nehmen mußten.

Wir sahen deshalb für die Hauptmenge unseres Grünmalzextraktes von einer Konzentrierung nach dem Ausfrierverfahren ab und setzten ohne weiteres gereinigtes krystallisiertes Ammoniumsulfat hinzu. Natürlich verbrauchte man hier infolge des großen Flüssigkeitsvolumens eine wesentlich größere Menge an Salz, da man für 100 ccm Extrakt mit mindestens 65 g Ammoniumsulfat rechnen muß. Um eine möglichst gesättigte Lösung zu erzielen, gaben wir so viel Salz zu, bis nichts mehr davon in Lösung ging. Es entstand ein reichlicher gelber Niederschlag, der selbst nach einigen Stunden keine Anstalten traf, sich abzusetzen. Doch zeigte er eine schöne Bruchbildung (Flocken). Wider Erwarten ließ sich der Niederschlag auf der Nutsche leicht absaugen, so daß ein ziemlich trockener Rückstand erhalten wurde. Auch die Filtration über glatte Filter ging gut von statten, wozu allerdings ein dreifacher Zeitaufwand nötig war. Als vorteilhaft wurde empfunden, daß der Extrakt durch den hohen Salzgehalt vor einem Verderben geschützt wird. Selbst nach vier Tagen zeigte sich weder eine Bakterientrübung noch eine Säurebildung. Der durch Ausfrieren konzentrierte Teil des Extraktes wurde ebenfalls mit Ammoniumsulfat gesättigt. Der entstandene Niederschlag ließ sich nur schwer absaugen und wurde deshalb filtriert. Alle durch Aussalzen gewonnenen Rückstände wurden nun vereinigt.

Den größten Teil davon verrieb man mit ganz wenig Wasser zu einem dicken Brei und gab ihn in einen Dialysator. Wir ließen vorsichtshalber die Dialyse bei niederer Temperatur (6°) vor sich gehen. Je länger man dialysiert, um so größer werden die Verluste, indem durch das Wegwandern des Salzes die ausgefällten Enzyme sich wieder auflösen können und bei der folgenden Filtration verloren gehen. Engt man aber, ohne zu filtrieren, den gesamten Dialysierrückstand über konzentrierter Schwefelsäure ein, so dauert dies einerseits übermäßig lange, und andererseits läßt sich dabei eine bedeutende Wiederanreicherung des Ammoniumsulfats nicht vermeiden. Auch zeigte es sich, daß Spuren der Enzyme die Membran durchwandern können; denn das Dialysat färbte sich gelb und gab mit Guajac-Harz eine deutliche Blaufärbung. Die Dialyse bringt demnach unvermeidliche, sehr große Verluste mit sich, die um so größer werden, je weiter die Entfernung des Salzes

getrieben werden soll. Wir unterbrachen nach 5 Stunden die Dialyse. Der ziemlich dünnflüssig gewordene Dialysierrückstand wurde über ein glattes Filter filtriert, was sehr viel Zeit in Anspruch nahm. Ein Absaugen war vollkommen unmöglich. Der vom Filter entfernte breiige Rückstand wurde auf einige flache Glasschalen ausgebreitet und über konzentrierter Schwefelsäure im Vakuumexsiccator getrocknet. Nach 24 Stunden war die Masse schwer knetbar; nach 48 Stunden war sie staubtrocken. Da das so erhaltene braune Pulver zahlreiche mit freiem Auge unterscheidbare Ammoniumsulfatkrystalle enthielt, die sich besonders an der Oberfläche angesammelt hatten, wurde durch inniges Verreiben eine gleichmäßige Mischung herbeigeführt. Dann ließ man noch kurze Zeit das Präparat an der freien Luft liegen. Es zeigte gegen Lackmus neutrale Reaktion und enthielt nur Spuren von Phosphaten. Mit Guajac-Harz ging es eine starke Reaktion ein.

Der nicht dialysierte kleinere Teil des mit Ammoniumsulfat aus dem Extrakt ausgesalzenen Niederschlags wurde in einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung aufgeschlemmt und auf ein Filter gegeben. Der Rückstand wurde dann mit einem Gemisch von 1 Teil Alkohol und 1 Teil Äther in einer Reibschale verrieben und auf einer Nutsche abgesaugt. Das Absaugen war in wenigen Sekunden beendet. Mit dem Alkoholäthergemisch wurde gründlich nachgewaschen. Endlich wurde der Niederschlag noch mit Äther allein in einer Reibschale behandelt, neuerdings abgesaugt, mit Äther ausgewaschen und in einer offenen Schale an der Luft stehen gelassen. Nach zwei Tagen war jeder Äthergeruch verschwunden. Wir erhielten so ein staubtrockenes, lockeres, gelbliches Pulver von neutraler Reaktion. Von Phosphaten konnten nur Spuren nachgewiesen werden. Die Guajac-Harz-Reaktion war deutlich, aber nicht so stark wie bei obigem über konzentrierter Schwefelsäure getrocknetem Präparat. Die Trocknung des ausgesalzenen Enzymniederschlages mit Alkoholäther, wie wir sie hier durchführten, hat den großen Vorzug der einfacheren und schnelleren Arbeitsweise. Da jedoch das Ammoniumsulfat in Alkohol unlöslich ist, so enthielt unsere Substanz natürlich viel von diesem Salz, das man aber makroskopisch nicht unterscheiden konnte. Die Masse schien gleichartig.

Um das Vorhandensein von Phytase und die Stärke der enzymatischen Kraft zu beobachten, führten wir mit beiden Präparaten ähnliche Versuche durch, wie wir sie vorher mit der durch Alkohol gefällten Phytase angestellt hatten. Zu 4 Proben von je 0,2 g Phytin, die in Bechergläsern mit 30 ccm Wasser und 0,5 ccm $^{n}/_{2}$-Natronlauge versetzt worden waren, gaben wir 0,4 g der Enzyme. Zu diesem Zweck löste man je 1,2 g der Pulver in je 90 ccm Wasser auf, wobei man durch Verreiben im Mörser eine innige Verteilung der Substanzen bewerkstelligte. Zu den Versuchen verwendete man je 30 ccm der betreffenden Enzymlösung. Je zwei Phytinproben wurden mit der gleichen Enzymlösung versetzt. In je einem der gleichartigen Versuche zerstörte man durch sofortiges 10 Min. langes Abkochen die Enzymkräfte vollständig. Alle vier Proben erwärmte man dann unter öfterem Durchrühren sieben Stunden lang auf 56°. Darauf wurden auch noch die beiden enzymkräftigen Versuche abgekocht. Nach dem Abkühlen und der Zugabe von 0,8 ccm $^{n}/_{2}$-Salzsäure zu allen Bechern wurde durch Aufwiegen die Wassermenge der Versuche auf 100 g ergänzt. Im Filtrat fällte man in je 75 ccm die anorganischen Phosphate durch Ammoniak und Magnesiamixtur aus. Beide ursprünglich nicht gekochten, enzymkräftigen Versuche zeigten hier noch deutlicher die schon bei den früheren Enzymversuchen bemerkten Unterschiede gegenüber den enzymvernichteten Proben: die Bildung eines starken Niederschlags mit Ammoniak allein, das schnellere und vollständigere Absetzen des Magnesiamixturniederschlags und das krystallinische Aussehen desselben. Das Auflösen der Rückstände vom Filter mit unserer verdünnten Salpeter-Schwefelsäure und die Fällung bei 50° mit der Molybdänlösung geschah wie vorher angegeben.

a) Mit Alkoholäther getrocknete Phytase.

Die enzymkräftige Probe lieferte . . 39,04 mg P_2O_5 = 52,06 mg P_2O_5 für 0,2 g Phytin.
Die enzymvernichtete Probe lieferte 3,67 mg P_2O_5 = 4,90 mg P_2O_5 für 0,2 g Phytin.

Demnach durch Phytasewirkung entstanden . . 35,37 mg P_2O_5 = 47,16 mg P_2O_5 für 0,2 g Phytin.

Durch diese Phytase sind also 66,80 % des Phytins gespalten worden.

b) Über konzentrierter Schwefelsäure getrocknete Phytase.

Die enzymkräftige Probe lieferte .	41,74 mg P_2O_5 =	55,66 mg P_2O_5 für 0,2 g Phytin.
Die enzymvernichtete Probe lieferte	3,85 mg P_2O_5 =	5,14 mg P_2O_5 für 0,2 g Phytin.
Demnach durch Phytasewirkung entstanden . .	37,89 mg P_2O_5 =	50,52 mg P_2O_5 für 0,2 g Phytin.

Durch diese Phytase sind also 71,58 % des Phytins gespalten worden.

Durch diese Versuchsreihe hat sich erwiesen, daß es auch nach der Aussalzmethode mit Ammoniumsulfat gelingt, ein stark phytasehaltiges Präparat zu gewinnen. Ein entscheidendes Urteil hier abgeben zu wollen über die Stärke der Enzymkräfte der nach den verschiedenen Verfahren erhaltenen Phytasen auf Grund des Grades der eingetretenen Phytinspaltung erscheint gewagt schon in Anbetracht der wechselnden Versuchsbedingungen und der verschiedenen Reinheit der vorliegenden Präparate. Wie erwähnt, muß besonders bei der mit Alkoholäther getrockneten Substanz mit einem sehr hohen Aschegehalt gerechnet werden, wodurch die Zahl, welche die auf die Gewichtseinheit berechnete Enzymstärke des Phytasepulvers ausdrücken soll, verkleinert wird. Wir verwendeten hier deshalb die gegen früher doppelt so große Menge von je 0,4 g der Enzyme zu unseren Versuchen. Die Wasserstoffionenkonzentration betrug während der enzymatischen Reaktionsprozesse $p_{H^\cdot} = 5{,}49$ bei den mit Alkoholäther getrockneten bzw. 5,41 bei den über Schwefelsäure getrockneten Proben; sie lag also in allernächster Nähe des Optimumpunktes. Bemerkenswert bleibt jedenfalls die Tatsache, daß es uns bei dieser Versuchsanordnung gelang, etwa drei Viertel des angewandten Phytins zu spalten.

Noch deutlicher als bei den Versuchen, die mit der durch Alkohol ausgeschiedenen Phytase angestellt worden waren, konnte man hier den hohen Grad der stattgefundenen Phytinspaltung ersehen aus einer Behandlung der Molybdänfiltrate mit Ammoniak und Magnesiamixtur. Während nämlich bei den

enzymvernichteten Proben dadurch ein sehr starker Niederschlag (Phytin) auftrat, konnte bei den enzymkräftigen Proben überhaupt keine Ausscheidung erzielt werden. Dadurch offenbart sich die weitgegangene Zersetzung des Phytins, das hier nur noch in so kleinen Mengen vorhanden sein kann, daß es in der verdünnten Lösung mit Ammoniak und Magnesiamixtur nicht mehr niedergeschlagen werden kann.

Ob es uns möglich sein wird, durch Reinigung unserer Rohphytasen noch wirksamere Produkte zu gewinnen, müssen erst weitere Untersuchungen zeigen. Vor allem soll es unsere Aufgabe sein, die diastatischen und die anderen enzymatischen Kräfte von der Rohphytase zu trennen, um einem eingehenderen Studium über Art, Verhalten und Wirkungsbedingungen der Phytase nähertreten zu können. Daß die phytinspaltenden Kräfte mit einer diastatischen Wirkung nicht unlöslich verbunden sind, ergibt sich schon aus obigen Versuchen mit Diastase-Maltin.

Zusammenfassung.

Ein äußerst einfaches und vollkommen einwandfreies Verfahren zur Bestimmung der anorganischen Phosphate bei Anwesenheit von Phytin auf Grund der Lorenz-Methode konnte angegeben werden.

Die Arbeitsmethoden, die seinerzeit C. J. Lintner zur Darstellung von Diastasepräparaten vorgeschlagen hat, lassen sich vorteilhaft auch zur Gewinnung von Phytase aus Malz verwenden. Sowohl durch eine Fällung mit Alkohol wie durch Aussalzen der Grünmalzextrakte mit Ammoniumsulfat gelingt es, nach entsprechender Weiterbehandlung Rohphytase als trockenes Pulver zu erhalten. Das so gewonnene Produkt ist noch keineswegs rein und besitzt auch andere Enzymkräfte.

Es glückte uns, bei der optimalen Wasserstoffionenkonzentration und der Temperatur der besten Wirksamkeit durch unsere Phytase etwa 72 % des angewandten Phytins zu zerlegen.

Über die gegenseitige Beeinflussung zweier verschiedener Hefen.

Von

Hans Euler.

Nach Versuchen von H. Gert und Erik Löwenhamn.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)

(Eingegangen am 13. April 1916.)

Mit 3 Figuren im Text.

Die alkoholische Gärung der Kulturhefen findet bekanntlich unter der Vermittlung von Aktivatoren statt, unter denen das sogen. „Koenzym" von Harden und Young am besten bekannt ist. Über eventuelle Verschiedenheiten dieses Aktivators in verschiedenen Hefen ist meines Wissens bis jetzt nichts bekannt geworden, und auch nach den Erfahrungen des hiesigen Laboratoriums bestehen solche Unterschiede nicht. Versuche, das Hardensche Koenzym aus anderen Mikroorganismen zu gewinnen, haben bis jetzt keinen Erfolg gehabt.

Auch über spezifische Aktivatoren des Wachstums, also spezifische Stoffe wie das „Bios" von Wildiers, liegen bis jetzt keine deutlichen Angaben vor, obwohl Anhaltspunkte über die Existenz solcher Stoffe nicht fehlen[1]). Versuche mit Vitaminen aus verschiedenen Heferassen haben mich veranlaßt, die in der Literatur vorliegenden Angaben über die gegenseitige Beeinflussung zweier Hefen nachzuprüfen, zunächst in drei Fällen bezüglich des Wachstums und mit einem Hefepaar hinsichtlich der Gärkraft.

Die ersten Versuche über die vorliegende Frage verdankt man Hansen[2]), der das gleichzeitige Wachstum von Saccha-

[1]) H. Euler und H. Cramér. Siehe Euler-Lindner, Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung, Leipzig 1915, Seite 230.

[2]) E. Chr. Hansen, Compt. rend. des trav. du lab. de Carlsberg 1, 1881.

romyces apiculatus und von Brauereiunterhefe in Mischkulturen untersuchte. Er kam zu dem Resultat, daß die beiden Hefearten ihr Wachstum gegenseitig ungünstig beeinflussen.

Müller-Thurgau[1]) untersuchte die gleichzeitige Entwicklung von Saccharomyces apiculatus und von elliptischen Weinhefen (Sacch. ellipsoideus); er fand, das Sacch. apiculatus die Weinhefen in ihrer Gärtätigkeit hindert, und zwar um so stärker, je schwächer die betreffende Weinhefe ist; die genauere Untersuchung dieser Gärversuche zeigte, daß die Beimengungen von Sacch. apiculatus die Hefenernte herabdrückt und also schon deshalb die Gärung hemmt, weil durch ihre Schuld weniger Hefezellen gebildet werden. Ob abgesehen von der Beeinträchtigung der Hefenentwicklung auch eine Änderung der Gärkraft der Zellen eintritt, wird nicht näher angegeben.

Die Frage nach der gegenseitigen Beeinflussung zweier Hefen im selben Kulturmedium wurde vor einiger Zeit wieder aufgenommen von A. J. J. Vandevelde[2]), der 6 Heferassen in den Kreis seiner Untersuchungen zog, nämlich 4 Bierhefen (Carlsberg, Saaz, Frohberg und Logos), eine Honighefe und Saccharomyces Pombe. Die verschiedenen Hefen wurden in peptonhaltigen Zuckerlösungen oder in Würze in Erlenmeyerkölbchen ausgesät, die Kölbchen mit Schwefelsäureventilen verschlossen und durch Wägung die entwichene Kohlensäure bestimmt. Auch aus dieser Arbeit läßt sich also nicht ersehen, ob eine Beeinflussung der Gärkraft stattfindet, oder ob sich nur die Vermehrung der Zellenzahl unter der Symbiose ändert. Beide Einflüsse zusammen bestimmen die Größe der Kohlensäureentwicklung. Dieser durch zwei Faktoren bestimmte Effekt wird im allgemeinen unter den von Vandevelde gewählten Versuchsbedingungen durch die Symbiose günstig beeinflußt; die einzelnen Ergebnisse müssen im Original nachgesehen werden.

In einer daran anschließenden Mitteilung über die Invertasereaktionen bei gemischten Hefekulturen kommen Vande-

---

[1]) Müller-Thurgau, 5. Jahresber. d. Schweiz. Versuchsanstalt in Wädenswil f. 1894/95, S. 76 und 7. Jahresber. d. Schweiz. Versuchsanstalt in Wädenswil f. 1896/97, S. 50. Siehe auch Lafars Handbuch der technischen Mykologie 4, 330 u. ff.

[2]) A. J. J. Vandevelde, Rep. 8. Intern. Kongreß appl. Chem. 14, 191, 1912.

velde und Vandestricht[1]) zu dem Ergebnis, daß für die Inversion keine Begünstigung festgestellt werden konnte. Bezüglich der Versuchsanordnung, gegen die vielleicht der eine oder andere Einwand gemacht werden kann, verweisen wir auf die zitierte Abhandlung.

Wir haben es für notwendig erachtet, die gegenseitige Beeinflussung der Vermehrung und des Gärvermögens getrennt zu untersuchen, da ja dabei voraussichtlich ganz verschiedene Aktivatoren oder Hemmungskörper in Betracht kommen. Dies war bei den früheren Arbeiten nicht geschehen.

Vermehrung der Zellenzahl in Mischkulturen.

Der Zuwachs der Hefen wurde durch Zählung in einem Thoma-Zeißschen Zählapparat bestimmt.

Die Hefezellen wurden aus Kulturen übergeimpft, in 300 bzw. 600 ccm Nährlösung, die nach Lindner zusammengesetzt war. Sie enthielt außer Zucker pro Liter:

0,25 g Magnesiumsulfat,
5,00 g Orthomonokaliumsulfat,
4,00 g Asparagin.

Auf die sterile Entnahme der Zählproben mittels Pipette aus den Lösungen wurde besonderes Gewicht gelegt; da sich bei dieser Methodik aber Infektion nicht vollkommen ausschließen läßt, so wurden alle Kulturen bei jeder Probeentnahme eingehend auf Infektion untersucht. Die Methode ist zwar sehr mühsam und zeitraubend, wir halten sie aber zuverlässiger als jede andere, vorausgesetzt, daß sie von einem geübten Mikrobiologen angewandt wird.

Bei der Herstellung der Mischkulturen wurde dafür gesorgt, daß sehr angenähert gleich viele Zellen der beiden Komponenten in die Nährlösung eingeimpft wurden. Leider konnten die Zellenzahlen der beiden Hefen in der Mischung nicht gesondert ermittelt werden. Die Zählung muß noch durch eine indirekte Methode ergänzt werden.

In der Regel wurden drei Kontrollfüllungen der Zähl-

[1]) A. J. J. Vandevelde und Vandestricht, diese Zeitschr. 51, 388, 1913.

kammer vorgenommen und jedesmal 60 Quadrate gerechnet. Nur wenn drei Versuche innerhalb 10 % übereinstimmten, wurde das Ergebnis zur Aufstellung der in den Figuren angegebenen Kurven benützt.

Ich gebe in folgender Tabelle das Resultat eines Versuches mit Sacch. Marxianus und Sacch. apiculatus an. Beide Hefen stammen aus dem Institut für Gärungsgewerbe in Berlin.

Tabelle I.

Stunden	Sacch. Marxianus		Sacch. apiculatus		Mischkultur	
	Zellenzahl	Logarithmus	Zellenzahl	Logarithmus	Zellenzahl	Logarithmus
0	10,9	1,037	14,9	1,173	18,1	1,257
24	24,0	1,380	23,8	1,377	38,2	1,582
48	63,0	1,793	45,0	1,653	99	1,995
72	166	2,220	84,0	1,924	252	2,401
96	522	2,718	176	2,245	792	2,899
108	—	—	316	2,500	—	—

In der Fig. 1 ist dieser Versuch graphisch dargestellt. Man findet, daß Sacch. apiculatus und Sacch. Marxianus ihr Wachstum unter den gewählten Versuchsbedingungen sehr wenig beeinflussen, sofern man die Gesamtzellenzahl der Mischkultur mit den Zellenzahlen der beiden Reinkulturen vergleicht. Ob hierbei die eine Hefe auf Kosten der anderen gewachsen ist, läßt sich aus diesen Zahlen nicht ersehen.

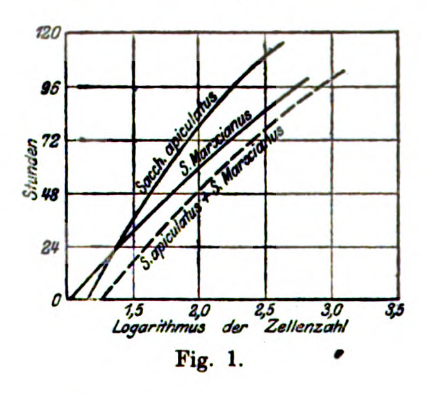


Fig. 1.

Damit ist die vorliegende Frage natürlich noch keineswegs allgemein erledigt, nicht einmal für die spezielle Symbiose Sacch. Marxianus und Sacch. apiculatus. Nur für den Fall, daß so wenig Zellen vorhanden sind, daß die Logarithmen der Zellenzahlen noch auf einer Geraden liegen, d. h. daß das einfache Entwicklungsgesetz gilt:

$$0{,}4343\, k't = \log (a + x) - \log a$$

beeinflussen sich nach obigem Ergebnis die beiden Hefen nicht; man kann daraus den Schluß ziehen, daß die beiden Hefen keine spezifischen Aktivatoren oder Paralysatoren des Wachstums an die umgebende Lösung abgeben.

Wird eine Mischkultur aus zwei Hefen hergestellt, die unter den gleichen Bedingungen einzeln in Reinkultur gezüchtet nicht dem einfachen Wachstumsgesetz folgen, sei es, daß die Zellenzahl zu groß ist, sei es aus einer anderen Ursache, so treten in der Mischkultur natürlich kompliziertere Verhältnisse auf; als Beispiel für eine derartige Mischkultur findet man in Fig. 2, die das Wachstum von Saccharomyces thermantitonum und unserer Brauerei-Unterhefe H graphisch darstellt. Von einer gewissen Zeit ab wächst nach anfänglich normalem Verlauf Sacch. thermantitonum auf Kosten der Hefe H, und zwar auffallenderweise nach 80 Stunden schneller als in der Reinkultur.

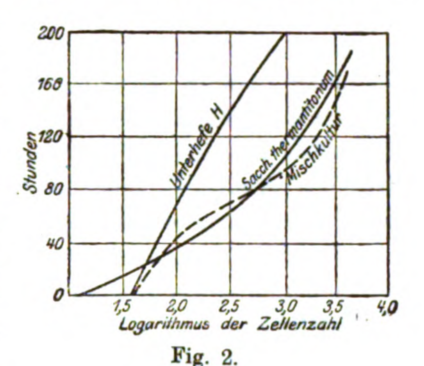


Fig. 2.

Bei der Mischkultur der Hefe H mit einer Oberhefe vom Froberg-Typus folgt die Entwicklungskurve nach kurzer Zeit derjenigen der Reinkultur der Oberhefe (Fig. 3), ohne jedoch die in der Reinkultur erreichte Zellenzahl zu überschreiten.

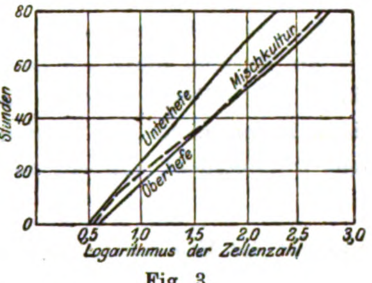


Fig. 3.

Herrn Dr. Gert danke ich bestens für die Ausführung dieser Versuche.

Die Gärkraft in Hefemischungen.

In Rücksicht darauf, daß die eingangs erwähnten Arbeiten vermuten ließen oder wenigstens die Möglichkeit nahelegten, daß zwei Hefen ihre Gärkraft, sei es im positiven, sei es im negativen Sinne, beeinflussen, wurden von Herrn Assistenten

Löwenhamn zahlreiche Versuche über die Kohlensäureentwicklung aus Hefegemisch angestellt. Es kam zur Verwendung eine Oberhefe vom Frohberg-Typus und unsere Unterhefe H.

Die Gärung ging in reinen Zuckerlösungen vor sich, ohne Gegenwart von Nahrungsstoffen, so daß ein Einfluß des Zuwachses auf die Resultate ausgeschlossen war.

Die Bestimmung der entwickelten Kohlensäure geschah volumetrisch; die Fehler, die bei dieser Arbeitsweise leicht dadurch auftreten, daß ein nicht genau bestimmbarer Teil der entwickelten Kohlensäure in der Reaktionsflüssigkeit gelöst bleibt, wurden teils dadurch vermieden, daß die Gärung bei großem Unterdruck — 30 cm Hg — stattfand, teils wurde wegen der geringen Löslichkeit bei diesem Druck eine Korrektion eingeführt. Während der gesamten Reaktionsdauer wurden die Gärkolben kräftig und gleichmäßig geschüttelt, was sich zur Erzielung genauer Ergebnisse unbedingt notwendig erwies, da die Übersättigung in Hefenemulsionen sehr beträchtlich ist.

Bei allen Versuchen wurde durch Gegenwart von Mononatriumphosphat die Konzentration der H-Ionen nach Sörensen auf konstantem Wert gehalten. Es wurde mit zwei verschiedenen Zuckerkonzentrationen gearbeitet, nämlich 3- und 6%igen Glucoselösungen.

Die Versuchstemperatur betrug stets 26°.

Als Beispiel führe ich eine der 12 ausgeführten Versuchsreihen an. Gleichzeitig mit den Mischversuchen wurden die reinen Hefen nicht nur in den der Mischung entsprechenden Mengen untersucht, sondern auch in den halben und doppelten.

Tabelle II.

20 ccm 5%ige Mononatriumphosphatlösung + 30 ccm 10%ige Glucoselösung. Temperatur 26°.

Stunden	Unterhefe H			Oberhefe G			Mischung 50% H + 50% G	
	4×0,15 g	2×0,8 g	²/₃×0,9 g	4×0,15 g	2×0,3 g	²/₃×0,9 g	0,6 g gef.	0,6 g berechnet
30	12,9	13,0	13,5	11,0	10,8	10,2	11,25	11,90
60	27,8	27,6	27,0	24,1	23,2	23,0	25,75	25,40
90	43,2	43,0	38,1	33,4	33,0	33,0	36,5	38,0
120	58,3	58,0	58,0	—	47,5	48,0	53,0	52,7
180	86,8	86,0	87,0	—	80,0	79,1	82,0	83,0

Mengen, um festzustellen, daß im vorliegenden Fall die Proportionalität zwischen Hefemenge und pro Zeiteinheit entwickelter Kohlensäure wirklich statthat. Dies war bei allen Versuchen, bei denen Fehler vollständig ausgeschlossen werden konnten, tatsächlich der Fall.

Sämtliche in der Tabelle II angegebenen Zahlen (ccm feuchte CO_2) sind Mittelwerte aus je zwei Versuchen. Die in der letzten Spalte verzeichneten „berechneten" Werte sind das arithmetische Mittel aus den Zahlen der zweiten und fünften Spalte.

Zusammenfassung.

Aus der Untersuchung dreier Mischkulturen unter verschiedenen Bedingungen ergab sich, daß zwar in der Mischung solcher Hefen, die in Reinkulturen nicht dem einfachen Entwicklungsgesetz folgen, gegenseitige Beeinflussung des Wachstums auftreten kann; bestimmte Anzeichen für die Ausscheidung von Aktivatoren oder Paralysatoren des Wachstums wurden aber bis jetzt nicht gefunden.

Beeinflussungen der Gärkraft fanden in den eingehend untersuchten Mischungen einer Oberhefe vom Frohberg-Typus und einer Brauerei-Unterhefe sicher nicht statt.

Einige Versuche über das Fett in der Bierhefe
(meist Brauereipreßhefe).

Von

Th. Bokorny.

(Eingegangen am 15. April 1916.)

Der Fettgehalt der Hefe ist schon vor langer Zeit entdeckt worden. Es soll (Euler, Hefechemie) 2 bis 5 % Trockensubstanz betragen. Nach Henneberg kommt es in den Hefezellen in Form zahlreicher meist kleiner Tröpfchen vor, aber auch in sehr feiner Verteilung (siehe unten).

Es soll der Fettgehalt auf 10 bis 20 % steigen können.

Mit dem Hefefett in Zusammenhang wurden von verschiedenen Autoren einige Inhaltskörper der Hefezellen gebracht, die teils im Hefeplasma, teils im Zellsaft beobachtet wurden und gelegentlich in „Lösung“ gehen, womit sie sich dann im Plasma unsichtbar verteilen.

Sie wurden als Vakuolfettkörper, Vakuolfetteiweißkörper benannt, je nachdem sie rein aus Fett oder aus Fett und Eiweiß bestehen.

Die Vakuolkörper sollen aber nicht immer aus Fett und Eiweiß bestehen, sondern nur bisweilen einen Oleingehalt besitzen.

Die echten Vakuolfettkörper sind rund oder rundlich, von starker Lichtbrechung, bisweilen beweglich (sogenannte Molekularbewegung), nach Methylenblauzusatz ungefärbt, dagegen nach Zusatz von Sudan oder Alkanna rotgefärbt (Fettreaktion).

Die häufigen typischen Vakuolkörper bestehen, wie die neuesten Untersuchungen Hennebergs[1]) zeigten, aus Volutin,

---

[1]) Centralbl. f. Bakt. 26. Febr. 1916.

d. i. aus einer Substanz, in der Henneberg das Gärungsenzym erblickt. Es ist kein eigentlicher Reservestoff. Die Zelle schont ihn nach Möglichkeit, er wird immer zuletzt aufgebraucht. Mit verdünnter (1 $^0/_0$iger) Methylenblaulösung nimmt er eine Violettfärbung an. Die Weißbierhefe enthält am meisten „Volutin". „Das Volutin ist das Gärungsenzym selbst oder ein bei der Gärung eine wichtige Rolle spielender Körper." Auch in der Kahmhefe findet sich Volutin, ferner in den Weißbiermilchsäurebakterien (hier dürfte das Volutin bei der Verwandlung von Zucker in Milchsäure tätig sein, somit ein anderes Enzym darstellen; es gibt überhaupt verschiedene Volutine, die Metachromasie, d i. die nach dem Absterben der Zellen eintretende Violettfärbung mit Methylenblau ist also eine Enzymgruppenreaktion).

Kehren wir zu den Vakuolfettkörpern zurück.

Wie die Versuche zeigen, ist das Fett manchmal zum größten Teil zunächst im Zelleiweiß in sehr feiner Verteilung („Lösung") vorhanden.

Bei langsamem Absterben (z. B. durch sehr verdünnten Formaldehyd) wird es (wie auch zuweilen das Glykogen) aus dem Plasma in die Vakuole als Tropfen eingepreßt, die einzelnen Massen fließen dann nicht selten zu einem größeren Tropfen zusammen."

Dieselben zeigen die oben erwähnte Rotfärbung mit Alkanna oder mit Sudan. Mit Methylenblau färben sie sich nicht.

Von Interesse sind die Wanderungen, die das Fett innerhalb der Zellen antreten kann.

Bald ist es im Plasma unsichtbar verteilt, bald in Tröpfchen gesammelt, die entweder im Plasma oder auch in der Vakuole ihren Sitz haben können.

Das entspricht ganz dem Charakter des Fettes als Re servestoff.

Bei dem hohen Calorienwert, den das Fett besitzt (3 mal so groß als Eiweiß und Kohlenhydrat), ist dasselbe ein äußerst wertvoller Reservestoff.

Seine Wanderungsfähigkeit ermöglicht die jederzeitige rasche Verwendung desselben.

Was die Art des Hefefettes anlangt, so ist dieselbe mehrfach untersucht worden.

Schon O. Loew hat (1878) festgestellt, daß in dem Hefefett Ölsäure, also eine ungesättigte Fettsäure vorhanden sei.

Dadurch ist das Hefefett, wie die meisten Pflanzenfette, flüssig.

Wenn man Trockenhefe mit Äther extrahiert und diesen verdunsten läßt, so hinterbleibt meist ein gelber Fetttropfen, seltener eine butterartige grauweißliche Masse.

Versuch 1.

Aqua destillata	100,0 g
Glutaminsäure	0,5 g
Rohrzucker	5,0 g
Glycerin	1,0 g
Monokaliphosphat	0,2 g
Magnesiumsulfat	0,05 g
Calciumchlorid	0,02 g
Preßhefe (von 30% Tr.-S.)	5,0 g.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nach 3 Tagen eine Vermehrung um 24%. Der Ätherextrakt der Trockensubstanz betrug nach der Ätherverdunstung 0,025 g, d. i. 0,5% Fett pro Frischgewicht und 1,66% pro Trockensubstanz.

Versuch 2.

Aqua destillata	100,0 g
Glutaminsäure	0,5 g
Rohrzucker	5,0 g
Monokaliphosphat	0,2 g
Magnesiumsulfat	0,05 g
Calciumchlorid	0,02 g
Preßhefe (von 30% Tr.-S.)	5,0 g.

Die Trockensubstanzzunahme betrug nach 3 Tagen 15%. Der Ätherextrakt liefert nach dem Verdampfen des Äthers einen Rückstand von 0,02 g. Also 0,4% Fett auf ursprüngliches Lebendgewicht und 1,33% auf ursprüngliche Trockensubstanz.

Versuch 3.

Ebenso wie 1, nur an Stelle der Glutaminsäure Harnstoff. Der Ätherextrakt lieferte an der nach 3 Tagen bestimmten

Trockensubstanz (15 % Zunahme) 0,025 g Rückstand; das macht 0,5 % **Fett im Frischgewicht** oder 1,66 % in der Trockensubstanz.

Versuch 4.

Ebenso wie 2, nur an Stelle der Glutaminsäure Harnstoff.

Der Ätherextrakt der nach 3 Tagen bestimmten Trockensubstanz (8 % Zunahme) lieferte 0,022 g Rückstand; das macht 0,45 % **Fett im Frischgewicht** oder 1,5 % in der Trockensubstanz.

Versuch 5.

Ebenso wie 1, aber statt Glutaminsäure Leucin.

Die Trockensubstanz (um 20 % vermehrt) lieferte mit Äther extrahiert 0,023 g Rückstand, also auch wiederum eine recht kleine Menge. Es ist 0,46 % Fett pro frische Preßhefe und 1,53 % pro Trockensubstanz.

Versuch 6.

Ebenso wie 2, aber statt Glutaminsäure Leucin.

Der Ätherextraktrückstand aus der (um 1,3 % vermehrten) Trockensubstanz betrug 0,020 g; also 0,4 % Fett in der frischen Preßhefe oder 1,33 % in der Trockensubstanz.

Versuch 7.

So wie 1, statt Glutaminsäure Pepton (Fleisch-).

Die Trockensubstanz nach 3 Tagen betrug um 24 % mehr als anfangs. Der Ätherextrakt ergab 0,021 g; also 0,42 % Fett pro frische Hefe und 1,4 % pro Trockensubstanz.

Versuch 8.

Ebenso wie 2, aber statt Glutaminsäure Pepton (Fleisch-).

Die Trockensubstanz betrug nach 3 Tagen um 16 % mehr als anfangs. Der Ätherextrakt ergab 0,020 g; also 0,4 % Fett pro Frischgewicht oder 1,33 % pro Trockensubstanz.

Versuch 9.

So wie 1, statt Glutaminsäure Asparaginsäure.

Die Trockensubstanz betrug nach 3 Tagen 10 % mehr als ursprünglich. Der Ätherextrakt ergab 0,020 g, d. i. 0,4 % Fett pro Frischgewicht oder 1,33 % pro Trockensubstanz.

Versuch 10.

Ebenso wie 2, statt Glutaminsäure Asparaginsäure.

Die Trockensubstanz betrug nach 3 Tagen 10 % mehr als ursprünglich. Der Ätherextrakt ergab 0,019 g; also 0,38 % Fett pro Frischgewicht oder 1,27 % pro Trockensubstanz.

Versuch 11.

So wie 1, aber statt Glutaminsäure Asparagin.

Die Trockensubstanz betrug nach 3 Tagen 25 % mehr als ursprünglich. Der Ätherextrakt ergab 0,022 g; d. i. 0,45 % Fett pro Frischgewicht oder 1,50 % pro Trockensubstanz.

Versuch 12.

Ebenso wie 2, statt Glutaminsäure Asparagin.

Die Trockensubstanz betrug nach 3 Tagen 8 % mehr als ursprünglich. Der Ätherextrakt ergab 0,021 g. Also 0,42 % Fett auf ursprüngliches Lebendgewicht und ca. 1,3 % Fett auf ursprüngliche Trockensubstanz.

Das sind durchaus geringe Fettmengen.

Versuch 13.

Ebenso wie 1, aber statt Glutaminsäure Tyrosin.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nach 3 Tagen 27 % mehr als ursprünglich. Der Ätherextrakt aus dieser hinterließ eingedunstet 0,019 g Rückstand.

Versuch 14.

So wie 2, aber statt Glutaminsäure Tyrosin.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nach 3 Tagen 24 % weniger als ursprünglich. Der Ätherextrakt aus dieser hinterließ eingedunstet 0,018 g Rückstand.

Versuch 15.

Ebenso wie 1, aber statt Glutaminsäure Glykokoll.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nach 3 Tagen 8 % mehr als zuerst. Der Ätherextrakt aus dieser hinterließ eingedunstet 0,019 g Rückstand.

Versuch 16.

So wie 2, aber statt Glutaminsäure Glykokoll.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nach 3 Tagen 4 %

mehr als zuerst. Der Ätherextrakt aus dieser hinterließ eingedunstet 0,017 g Rückstand.

Versuch 17.

Ebenso wie 1, aber statt Glutaminsäure Ammonsulfat.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nach 3 Tagen 30% mehr als zuerst. Aus dem Ätherextrakt der Trockensubstanz ergab sich 0,03 g Rückstand.

Versuch 18.

Ebenso wie 2, aber statt Glutaminsäure Ammonsulfat.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nach 3 Tagen 9% mehr als anfangs. Der Ätherextrakt der Trockensubstanz hinterließ beim Eindunsten 0,025 g Rückstand.

Die Eindampfung des Ätherextraktes wurde in blanken Platinschälchen vorgenommen.

Der Rückstand bestand nur selten aus kleinen gelblichen Tröpfchen, meist war es eine weiche butterähnliche Masse von grauweißlicher Farbe.

Das erhaltene Fett war also meist nicht wirklich flüssig, sondern von einer festen, aber weichen Beschaffenheit.

In allen Fällen betrug der Rückstand so wenig, daß man von einer erheblichen Fettbildung nicht sprechen konnte.

Die ursprüngliche Fettmenge in der zu den Versuchen verwendeten Brauereipreßhefe betrug 0,035 g pro 5 g Hefe.

Es war also in dieser Anfangshefe noch etwas mehr Fett vorhanden als in der in den Nährlösungen gezogenen.

So viel geht aus den Versuchen deutlich hervor, daß man nicht durch 2- bis 3tägige Kultur der Hefe in Nährlösungen, auch in den besten, eine Anhäufung von Fett in der Hefe erzielen könne.

Die Fettmengen, die nachher gefunden wurden, blieben sogar hinter der ursprünglich vorhandenen zurück.

Offenbar wurde das in der Preßhefe vorhandene Fett durch den lebhaften Sprossungsvorgang in den Nährlösungen teilweise verbraucht.

Alle Bedingungen zu einer guten Ernährung der Hefe waren geboten.

Als C-Quelle stand Zucker zur Verfügung.

Der Stickstoff war in Form von Aminokörpern geboten, die bekanntlich gute N-Quellen für Hefe sind.

Durch die eingetretene Gärung wurde die Hefe beständig in Schwebe erhalten, so daß die Zellen mit den Nährstoffen in ausreichender Berührung waren. Der Zucker wurde dabei großenteils vergoren, aber auch zum kleinen Teile zur Ernährung verwendet, wie aus der eingetretenen Trockensubstanzvermehrung hervorgeht.

Trotz alledem kein Fettansatz!

Um nun doch noch zum Ziele zu gelangen, wurden Nährlösungen hergestellt, die als organische Nahrung außer dem Zucker Pepton, den besten aller Nährstoffe für Hefe, enthielten. Die Versuche wurden unter öfterem Zuckerzusatz auf 8 Tage ausgedehnt.

Faktisch gelang es damit, den Fettgehalt bedeutend zu vermehren.

Versuch 1.

Wasser	200,0 g
Rohrzucker	10,0 g
Pepton	1,0 g
Monokaliphosphat	0,2 g
Magnesiumsulfat	0,05 g
Calciumchlorid	0,02 g
Preßhefe (von 30 % Tr.-S.)	10,0 g.

Dieser wie auch die zwei folgenden Versuche wurden am 29. I. im geheizten Zimmer aufgestellt, und zwar in geräumigen bedeckten Glasschalen, an denen nur der Boden bedeckt war. Nach 3, 6, 8 Tagen wurde überall von neuem Rohrzucker zugefügt.

Die Gärung trat wiederholt ein. Am 10. Tage wurde mikroskopisch geprüft; die Hefe wies viele Sprossungen auf. Außer ihr aber auch Bakterien.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab (nach 10 Tagen) 2,5 g, also eine Abnahme. Offenbar begann schon ein Absterben der Hefe. Der Ätherextrakt ergab 0,07 g Rückstand (butterartig), also 0,7 % Fett pro Frischgewicht oder 2,33 % pro Trockensubstanz.

Versuch 2.

Wasser	200,0 g
Rohrzucker	10,0 g
Milchzucker	1,00 g
Pepton	1,00 g
Monokaliphosphat	0,2 g
Magnesiumsulfat	0,05 g
Calciumchlorid	0,02 g
Preßhefe (von 30 % Tr.-S.)	10,0 g.

Sonst wie vorhin.

Am 10. Tage wurde die Hefe mikroskopisch untersucht. Sie zeigte sich mit Bakterien verunreinigt, wies aber häufige Sprossungen auf.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab (nach 10 Tagen) 2,8 g, also eine kleine Abnahme (vermutlich infolge beginnenden Absterbens der Hefe).

Die Fettbestimmung ergab 0,13 g eines gelben flüssigen durchsichtigen schwach schmeckenden Fettes. Also 4,64 % Fett in der Trockenhefe und 1,3 % in der lebenden Hefe.

Versuch 3.

Wasser	200,0 g
Rohrzucker	10,0 g
Pepton	1,0 g
Ammonsulfat	0,5 g
Monokaliphosphat	0,2 g
Magnesiumsulfat	0,05 g
Calciumchlorid	0,02 g
Preßhefe (von 30 % Tr.-S.)	10,0 g.

Sonst wie bei 1.

Am 10. Tage wurde die mikroskopische Untersuchung angestellt.

Dieselbe ergab, daß die Hefe vielfach gesproßt hatte; neben ihr auch etwas Bakterien. Viele der (vakuolenreichen) Hefezellen waren eben im Begriffe, zu Schläuchen auszuwachsen.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab (nach 10 Tagen) 3,00 g, also keine Zunahme.

Der Ätherextrakt ergab einen Rückstand von 0,12 g, also

4,00 % Fett in der Trockensubstanz und 1,2 % in der frischen wasserhaltigen Preßhefe. Der ursprüngliche Fettgehalt der Versuchshefe hatte nur 0,9 % der Trockensubstanz betragen.

Durch längere Ausdehnung der Versuche unter wiederholter Zuckerbeigabe zur Nährflüssigkeit kann man also den Fettgehalt der Hefe wesentlich erhöhen, wenn auch Pepton als N- und C-Quelle verwendet wird (ursprünglich nur 1,3 % Fett in der Trockensubstanz).

Weitere Versuche wurden nun in demselben Sinne, aber unter Anwendung von Harn als billigste Stickstoff- und zugleich Phosphor- und Kaliquelle angestellt. Dem Harn wurde nur Zucker in den nachher anzugebenden Quantitäten zugesetzt; der Zuckerzusatz wurde öfters repetiert.

Der Harn wurde meist auf das 4 fache verdünnt, manchmal aber auch unverdünnt angewendet. Die Temperatur war Zimmertemperatur.

In dem menschlichen Harn sind durchschnittlich enthalten: Harnstoff 2 %, Harnsäure 0,048 %, Kreatinin 0,1 %, Hippursäure 0,048 %, sonstige organische Stoffe 0,14 %, Chlornatrium 1 %, Phosphorsäure (P_2O_5) 0,16 %, Schwefelsäure (H_2SO_4) 0,16 %, Kali 0,22 %, Ammoniak 0,048 %, Kalk (CaO) 0,02 %, Magnesia (MgO) 0,034 %, weitere unorganische Stoffe 0,014 %. Es sind also alle für die Hefe nötigen Mineralstoffe vorhanden, der Stickstoff als Harnstoff.

Versuch a.

Harn	50 ccm
Wasser	150 ccm
Hefe (Brauereipreßhefe)	10 g (mit 3,0 g Tr.-S.)
Rohrzucker	10 g (alle 2 Tage erneuert).

Um die Teile schwebend zu erhalten, wurden alle 3 Tage von neuem 10 g Rohrzucker zugesetzt. Die eintretende Gärung verhinderte das Absitzen der Hefe, die Kohlenstoffernährung und Stickstoffernährung konnte fortlaufen.

Nach 14 Tagen Reaktion sauer geworden. Nun wurde die Trockensubstanzbestimmung gemacht. Sie ergab 11,50 g Trockensubstanz. Daraus konnte mit Äther 0,05 g Fett extrahiert

werden. D. i. 0,44% Fett in der Trockensubstanz oder 0,132% Fett in der frischen Preßhefe.

Versuch b.

Harn . . .	50 ccm
Wasser . .	150 ccm
Hefe . . .	10 g (mit 3,0 g Tr.-S.)
Rohrzucker	10 g (alle 2 Tage erneuert)
Glycerin .	2 g.

Auch hier wurde der Zucker alle zwei Tage von neuem zugesetzt, die Hefe blieb schwebend.

Nach 14 Tagen war saure Reaktion eingetreten.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab 9,3 g. Die Ätherextraktion des letzteren lieferte 0,065 g Fett, d. i. 0,70% Fett in der Trockensubstanz oder 0,210% Fett in der frischen Preßhefe.

Das ist wiederum eine recht geringe Menge von Fett.

Versuch c.

Harn . . .	50 ccm
Wasser . .	150 ccm
Hefe . . .	10 g (mit 3,0 g Tr.-S.)
Rohrzucker .	10 g (alle 2 Tage erneuert)
Methylalkohol	2 g.

Alle 2 Tage wurde 10 g Rohrzucker von neuem zugesetzt, die Gärung trat immer wieder ein. Die Hefe blieb schwebend.

Nach 14 Tagen war saure Reaktion eingetreten.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nun 11,00 g.

Hieraus wurde mit Äther 0,07 g Fett ausgezogen.

Das macht 0,64% Fett in der Trockensubstanz, d. i. 0,192% Fett in der frischen Preßhefe.

Versuch d.

Harn . . .	50 ccm
Wasser . .	150 ccm
Hefe . . .	10 g (mit 3,0 g Tr.-S.)
Rohrzucker .	10 g (alle 2 Tage erneuert)
Äthylalkohol	2 g.

Auch hier wurde durch alle zwei Tage erfolgende Erneuerung des Zuckers die Hefe immer schwebend erhalten.

Als nach 14 Tagen die Reaktion der Flüssigkeit sauer geworden war, wurde die Trockensubstanzbestimmung gemacht.

Es ergab sich 12,00 g Trockensubstanz.

Darin befanden sich (mit Äther extrahiert) 0,100 g Fett, d. i. 0,83 % Fett in der Trockensubstanz oder 0,249 % Fett in der frischen Preßhefe.

Versuch e).

Harn . . .	200 ccm (unverdünnt)
Hefe . . .	10 g (mit 3,0 g Tr.-S.)
Rohrzucker .	10 g (alle 2 Tage erneuert).

Durch Zuckererneuerung wurde die Hefe schwebend erhalten.

Nach 14 Tagen war die Reaktion noch neutral.

Die Trockensubstanzbestimmung ergab nun 7,05 g Trockensubstanz, also wesentlich weniger als bei den vorausgehenden Versuchen. Der unverdünnte Harn scheint nicht so günstig zu wirken wie verdünnter.

Die Fettbestimmung ergab 0,06 g.

Das ist 0,86 % Fett in der Trockensubstanz oder 0,29 % Fett in der frischen Preßhefe.

Es ist ohne weiteres ersichtlich, daß bei sämtlichen mit Harn als einziger Stickstoffquelle der Hefe angestellten Versuchen nur ein geringer Fettgehalt resultiert.

Dabei ergab sich eine auffallend hohe Trockensubstanzvermehrung.

Der Harn scheint also für die Vermehrung der Hefe sehr günstig zu sein, auf das Vierfache verdünnter noch mehr als unverdünnter.

Was den Harnstoff als Stickstoffquelle angeht, so haben hierüber schon Naegeli und Loew (1878)[1]) Versuche angestellt. Dieselben haben unter gewissen Umständen positives Resultat ergeben.

Harn ernährt hiernach bei Luftabschluß die Sproßpilze nicht, mag man ihn mit Säuren versetzen oder nicht. Bei Luftzutritt vermag er ziemlich reichliche Sproßhefe zu bilden,

---

[1]) Ak. d. Wiss. 1878, S. 321.

wenn man ihm zur Abhaltung der Spaltpilze 0,5 bis 1 % Weinsäure und Citronensäure zufügt. Bei Zusatz von Glycerin (4,5 bis 9 %) vermehren sich die Sproßpilze, wenn die Luft abgehalten wird, ebenfalls nicht, dagegen begünstigt das Glycerin die Vermehrung bei Luftzutritt sehr beträchtlich.

Als Kohlenstoffquelle scheint in ersterem Falle die Weinsäure und Citronensäure zu dienen; denn der Harnstoff (Hauptbestandteil des Harns) kann, wie Naegeli anderweitig festgestellt hat, nicht als C-Quelle für Hefe dienen.

Wird der Harn mit Zucker (9 %) und Säure (0,5 oder 1 % Citronensäure) versetzt, so findet bei Luftabschluß reichliche Sproßhefebildung, dann aber auch Spaltpilzbildung statt, was wohl so zu erklären ist, daß der Harnstoff in kohlensaures Ammoniak übergeht, wodurch die Säure neutralisiert wird.

Enthält der Harn 9 % Zucker und 5 % Alkohol, so bleibt bei Luftabschluß die Vermehrung der Sproß- und Spaltpilze aus, während bei Luftzutritt zuerst die Spaltpilze sich vermehren und Milchsäure erzeugen, worauf die Sproßpilze zu wachsen beginnen.

Wir sehen, daß die Hefe mit den Nährstoffen des Harns gedeiht, wenn eine gute C-Quelle zugesetzt wird; bei Darbietung von Zucker braucht sie nicht einmal Sauerstoff.

Da der Harn auch reichlich Phosphate enthält, so stellt er eine sehr günstige Hefenahrung dar, wenn auch Zucker zugefügt wird. Das haben schon Naegeli und Loew gefunden.

Die Notwendigkeit des Zucker-(Melasse-)Zusatzes ist nun der springende Punkt in der ganzen Hefeerzeugungsfrage.

Über die Stickstoffzufuhr braucht man sich weniger Sorge zu machen, da derselbe als Ammoniaksalz oder als Harn zugeführt werden kann. Das Ammoniak kann in beliebiger Menge aus Luftstickstoff hergestellt werden, gegen die Verwendung des Harns für Futterhefe dürften sich kaum Stimmen erheben.

Zucker ist aber eine wertvolle Substanz, die von der Landwirtschaft zu Futterzwecken begehrt wird. Ohne Zucker scheint jedoch die geplante Hefeerzeugung nicht zu gelingen, obwohl es für Hefe noch manche andere Kohlenstoffquellen gibt. Der Zucker aber bietet den enormen Vorteil, daß er durch die eintretende Gärung der Hefe eine günstige Position gegenüber den schwer auszuschließenden Bakterien schafft.

Man wird wohl darauf sehen müssen, daß ein Zucker zur Stelle gebracht wird, der von den Landwirten nicht erzeugt und nicht beansprucht wird (Holzzucker, synthetischer Zucker, letzterer ist freilich bis jetzt nicht fabriziert worden).

Für die Fetthefe allerdings, die auch im Plane der Zeit liegt, scheint mir eine Harnstoffernährung der Hefe nicht günstig zu sein.

Wie wir oben sahen, ergab die Ernährung der Hefe mit verdünntem Harn auch bei wiederholtem reichlichem Zuckerzusatz keine nennenswerten Fettmengen in dieser.

Wohl aber erhielt ich Fettanhäufung bei Anwendung von Pepton als Stickstoff-(u. C-)Quelle sowie reichlichem wiederholtem Zusatz von Zucker.

Da Pepton eine zu teure Stickstoffnahrung ist, stellte ich noch einen Versuch mit Ammoniakernährung unter ebenfalls reichlicher und wiederholter Zufuhr von Zucker an, wobei der Versuch ebenfalls auf acht Tage ausgedehnt wurde.

Von der Ammoniakernährung sagt Naegeli[1]), daß das Wachstum der Sproßpilze äußerst lebhaft sei, wenn neben Ammoniaksalz sich Zucker in der Nährlösung befindet und wenn reichlich Sauerstoff zutritt. Doch werde bei ausschließlicher N-Ernährung mit Ammoniaksalz die Hefe geschwächt und sterbe zuletzt ab.

Enthält beispielsweise die Nährlösung 9 % Zucker, 1 oder 0,5 % neutrales weinsaures Ammoniak und etwas mit Phosphorsäure neutralisierte Erbsen- oder Hefenasche, und wird diese Lösung je nach zwei Tagen erneuert, so kann während der ersten vier Tage die Hefe sich auf das vierfache Gewicht vermehren, wenn die Trockensubstanz der jedesmal zur Aussaat benutzten Hefemenge 3 bis 4 % der Nährflüssigkeit ausmacht. Aber das Wachstum ist am Ende dieser kurzen Zeit schon viel träger geworden, und es hört bei Fortsetzung des Versuches bald ganz auf, wobei die Spaltpilze die Oberhand gewinnen. Durch Erhöhung der Temperatur auf Brutwärme, durch reichliche Luftzufuhr, durch Zusatz einer größeren Menge von Kaliphosphat und durch Anwendung von Nährsalzen statt der Asche wird zwar die Vegetation im allgemeinen sehr befördert, und durch etwas Säure werden die Sproßpilze gegenüber den Spaltpilzen begünstigt.

[1]) a. a. O. S. 523.

Doch erleiden selbst unter den allergünstigsten Bedingungen die Sproßpilze, die den Stickstoff bloß in Form von Ammoniak erhalten, eine zunehmende Schwächung und gehen ihrem sicheren Untergang entgegen.

Es läßt sich das Gewicht der Bierhefe mit Zucker und weinsaurem Ammoniak unter Durchleitung von Luft im Brutkasten während 64 Stunden auf das 12 fache vermehren. Aber die Hefezellen sind dann viel fettreicher und stickstoffärmer geworden, und sie sind in ihrer Lebensenergie geschwächt, indem sie an Gärtüchtigkeit eingebüßt haben und viel leichter der Konkurrenz der Spaltpilze unterliegen.

Wird der Zutritt der Luft verhindert, so vermögen Ammoniaksalze mit Zucker die Sproßpilze zwar noch durch viele Generationen hindurch zu ernähren, aber die Vermehrung ist jetzt eine viel geringere und hört infolge von Erschöpfung nach viel weniger Generationen auf als bei Luftzutritt.

Befindet sich Zucker oder Glycerin in der Nährflüssigkeit, so verhalten sich die verschiedenen Ammoniaksalze fast gleich, insofern sie nicht antiseptisch wirken; auch das salpetersaure Ammoniak gibt keine ungünstigeren Resultate als die übrigen.

Dabei muß jedoch beachtet werden, daß bei Abschluß von Luft die Sproßpilze (wie alle Pilze) viel empfindlicher sind und daher ein allfälliger Säurezusatz sehr vorsichtig zu bemessen ist. Gänzlicher Mangel an freier Säure gewährt zwar die günstigsten Bedingungen für das Wachstum der Sproßpilze, aber auch die größte Gefahr, daß sie durch Spaltpilze verdrängt werden.

In den untenstehenden auf Fettbildung abzielenden Hefeversuchen ist die saure Reaktion der Flüssigkeit nicht durch freie Säure, sondern durch nicht zu große Mengen Monokaliumphosphat hervorgerufen.

Denn auch meine Versuche haben ergeben, daß freie Säure bald schädlich wirkt:

a)	Preßhefe 1 g (von 0,3 g Tr.-S.)	Nährlösung 100 ccm (Rohrzucker Tg + Pepton 0,5 + $PO_4KH_2O_1$ 2 + Bittersalz 0,1 g)	freie Phosphorsäure 0,1 g
b)	do.	do.	do. 0,25 g
c)	do.	do.	do. 0,5 g

Schon bei a) mit 0,1 % freier Phosphorsäure zeigte sich eine schädliche Wirkung der Säure, indem die Trockensubstanzvermehrung geringer war als bei einem Kontrollversuch ohne freie Phosphorsäure.

Noch geringer war die Trockensubstanzvermehrung bei b).

Hingegen ergab sich bei c) eine bedeutende Verminderung der Trockensubstanz gegenüber der ursprünglichen (um 50 %) binnen 48 Stunden bei 20 bis 25°.

d)	Preßhefe 1 g (von 0,3 g Tr.-S.)	Nährlösung 100 ccm (von obiger Zusammensetzung)	freie Milchsäure 0,5 g
e)	do.	do.	do. 1,0 g
f)	do.	do.	do. 0,1 g
g)	do.	do.	do. 0,25 g

Bei d) trat nicht mehr ganz normale Trockensubstanzvermehrung ein.

Bei e) war die Trockensubstanzvermehrung bedeutend verringert.

Bei f) fast normale Trockensubstanzvermehrung.

Bei g) nicht unbeträchtliches Zurückbleiben der Vermehrung.

Versuche mit freier Weinsäure ergaben, daß diese fast gerade so schädlich wirkt wie die freie Phosphorsäure.

Somit ist Vorsicht in diesem Punkte sehr am Platz.

Folgende zwei Versuche (A u. B) wurden mit weinsaurem Ammoniak als N-(u. C-)Quelle ohne freie Säure angestellt. Monokaliphosphat wurde angewendet. Der Zucker wurde alle zwei Tage erneuert.

Versuch A.

Hefe (von 31 % Tr.-S. und nur 0,2 % Fett i. Tr.-S.) .	5,0 g
Weinsaures Ammoniak . .	2,0 g
Zucker (reiner Rohr-) . .	25,0 g (alle 2 Tage erneuert).
Monokaliumphosphat . .	0,5 g
Magnesiumsulfat	0,2 g
Calciumchlorid	0,1 g
Wasser	1000,0 g

Nach 8 Tagen war die Flüssigkeit noch in voller Gärung, stark trüb mit kräftiger Hefedecke und noch stärkerem Boden-

satz. Dieselbe wurde nun filtriert, die Hefe auf dem Filter gesammelt.

Die mikroskopische Untersuchung ergab, daß die Hefe lebend war; daneben waren freilich auch Bakterien aufgekommen. Ein saurer oder fauliger Geruch war aber nicht eingetreten.

Die Trockensubstanzbestimmung in der Hefe ergab 3,2 g.

In dieser Trockensubstanz waren 0,03 g Fett, d. i. 0,94 % Fett in der Trockensubstanz. Das ist eine so geringe Fettmenge, daß man von einem Erfolg des Versuchs A in bezug auf Fettproduktion nicht sprechen kann.

Das vorhandene weinsaure Ammoniak war also zur Vermehrung der Trockensubstanz bis auf beinahe das Doppelte der ursprünglichen verwendet worden, ohne daß ein Fettansatz stattfand.

Versuch B.

Hefe (von 31 % Tr.-S. und 0,2 % Fett)	5,0 g	
Weinsaures Ammoniak . .	5,0 g	
Zucker (reiner Rohr-) . .	25,0 g	(alle 2 Tage erneuert).
Monokaliumphosphat . .	0,5 g	
Magnesiumsulfat	0,2 g	
Calciumchlorid	0,1 g	
Wasser	1000,0 g	

Auch hier wurde nach acht Tagen, als die Flüssigkeit noch in lebhafter Gärung und trüb war, sowie Decke und Bodensatz aufwies, filtriert. Die Hefe wurde auf dem Filter gesammelt.

Bei mikroskopischer Untersuchung zeigte sich die Hefe lebend, aber ziemlich stark mit langgestreckten (Mycoderma-?) Zellen und mit Bakterien durchsetzt. Ein saurer oder fauliger Geruch war nicht aufgetreten.

Die Trockensubstanzbestimmung in der Hefe ergab 4,2 g.

Die Ätherextraktion dieser Trockensubstanz ergab 0,02 g Rückstand.

In dieser Trockensubstanz waren also nur 0,02 g Fett nachweisbar, d. i. 0,48 % der Trockensubstanz.

Hier war die Trockensubstanz auf das $2^1/_2$ fache gewachsen, ohne daß Fett angesetzt wurde (ursprünglicher Fettgehalt ebenfalls minimal).

Somit sind von allen angeführten Versuchen über Fettanhäufung in der Hefe nur drei (siehe oben Versuch I, II, III) positiv ausgefallen. Dieselben waren einander in bezug auf Nährstoffgehalt der Nährflüssigkeiten ähnlich und unterschieden sich von den anderen durch reichlichen Gehalt an Pepton und andern guten Nährstoffen; der Zuckerzusatz wurde alle zwei Tage repetiert.

Es ist klar, daß ein solches Verfahren nur theoretisches Interesse haben kann.

Über die Fettbildung bei niederen Pilzen haben Naegeli und Loew schon 1878 (Ak. d. Wiss. zu München) bemerkenswerte Versuche publiziert.

Nach denselben kann Fett sowohl aus Eiweiß wie auch aus Kohlenhydrat gebildet werden.

„Es ist eine allgemeine Erscheinung, daß in Pilzzellen, die in der Jugend bloß plasmatischen (aus Albuminaten bestehenden) Inhalt besitzen, späterhin mehr oder weniger Fett auftritt.

Dies ist auch dann der Fall, wenn sich dieselben in reinem Wasser befinden und sie somit keine fettbildenden Stoffe aufnehmen können; denn das kohlensaure Ammoniak, das sich nicht abhalten läßt, vermögen sie nicht zu assimilieren.

Man beobachtet daher auch, daß das Plasma mit dem Erscheinen des Fettes sich vermindert.

Daß letzteres hier nicht von stickstofffreien Kohlenstoffverbindungen abgeleitet werden kann, ergibt sich aus dem Umstand, daß solche nur in sehr geringen Mengen im Zellinhalte vorkommen, und daß die aus Cellulose bestehende Membran während der Fettbildung an Substanz oft deutlich zunimmt."

Es muß die Fettbildung aus Albuminaten stattgefunden haben.

Schimmelpilze sind, weil sie mehr Fett erzeugen, für solche Beobachtungen brauchbarer als Hefepilze.

Aber auch an Sproßpilzen läßt sich das nachweisen.

Einige Flaschen mit Bierhefe und phosphorsäurehaltigem Wasser wurden zwei Jahre lang stehen gelassen und hin und wieder umgeschüttelt. Es stellten sich weder Schimmel- noch Spaltpilze ein. Die Hefezellen vegetierten langsam fort. Beim Beginne des Versuchs waren die dünnwandigen Zellen bloß mit

Plasma erfüllt. Zuletzt erschien die Membran etwas stärker, und der feste Zellinhalt war auf ein kleines sehr stark lichtbrechendes Körnchen zusammengegangen, das offenbar aus Fett und den noch ungelösten Albuminaten bestand.

Peptonlösungen (mit den nötigen Mineralstoffen) werden von Schimmel unter Fettproduktion assimiliert, ebenso Asparagin- und Leucin-Lösungen; ebenso Zucker mit Ammoniak, weinsaures Ammoniak usw.

„Die Versuche beweisen unzweifelhaft, daß die Pilzzellen das Material für die Fettbildung aus den verschiedensten stickstoffhaltigen und stickstofflosen Verbindungen entnehmen können.“

Damit ist freilich der physiologische Weg der Fettbildung noch nicht lückenlos angegeben, wenn man nur das Ausgangsmaterial kennt.

Vermutlich werden alle jene zur Fettbildung als geeignet erkannten Stoffe zuerst in Protoplasmaeiweiß (eventuell unter Beiziehung noch anderer Stoffe) verwandelt und gelangen auf diesem Weg in den Fettbildungsprozeß hinein. Alles Fett wird wahrscheinlich, wie auch sonstige Reservestoffe, aus dem Protoplasma ausgeschieden und durch Abspaltung aus Molekülen aktiven Proteins gebildet.

Hinsichtlich des physiologischen Verhältnisses des Fettbildungsprozesses zu der Gesamternährung stellte Naegeli folgende zwei Regeln auf: 1. Daß verhältnismäßig um so mehr Fett gebildet wird, je lebhafter das Wachstum vor sich geht, daß also bei n-facher Gesamtzunahme der Trockensubstanz in gleicher Zeit und unter übrigens gleichen Umständen die Vermehrung der Fettmenge mehr als den n-fachen Betrag zeigt[1]). 2. Daß unter gleichen Umständen um so mehr Fett gebildet wird, je lebhafter die Respiration (Oxydation durch freien Sauerstoff) vor sich geht. Es bedarf kaum der Erwähnung, daß dies in aller Strenge nur für jede einzelne Pilzform gilt und daß bei der Vergleichung verschiedener Formen ein neuer Faktor, die spezifische Neigung zur Fettbildung hinzukommt.

Zur Illustration des letzteren Punktes gibt Naegeli einen

---

[1]) Das dürfte aber doch nicht ausnahmslos der Fall sein; denn ich habe (siehe oben) beobachtet, daß stark gewachsene Hefe einen geringeren Fettgehalt aufwies.

interessanten Überblick über das Fettvorkommen bei Pilzen und dessen Zusammenhang mit dem Sauerstoff.

Die Schimmelpilze wachsen bloß bei Zutritt von freiem Sauerstoff und sind fettreich.

Die Bierhefe entwickelt sich bei sehr mangelhaftem Sauerstoffgenuß und ist fettarm; das gleiche gilt für die Spaltpilze.

Die an der Oberfläche der Nährflüssigkeit lebenden Schimmelpilze sind fettreicher als ihre eigenen untergetauchten Sproßformen.

Zur Bildung der Sporen, welche viel Fett enthalten, ist freier Luftzutritt notwendig.

Die Sproßpilze bringen, wie bekannt, nur dann Sporen hervor, wenn sie, auf einem Substrat ausgebreitet, halb trocken liegen.

Die Spaltpilze erzeugen, wie es scheint, ihre Sporen ebenfalls nie innerhalb einer Flüssigkeit, sondern nur in den oberflächlichen Decken, und zwar beobachtete Naegeli einige Male ganz bestimmt, daß in einer mehrschichtigen Decke bloß die Stäbchen und Fäden der obersten (unmittelbar an Luft grenzenden) Schicht sporentragend waren.

In Flüssigkeiten lebende Schimmelpilze bilden nur an den in die Luft sich erhebenden Hyphen fettreiche Dauersporen.

„Warum die Pilze zur Erzeugung von Fett gerade Sauerstoff bedürfen, bleibt vorerst noch eine offene Frage. Es gibt noch andere Beispiele, wo die Umwandlung von sauerstoffreicheren in sauerstoffärmere Verbindungen in der organischen Welt nur unter Einwirkung von Oxydation vor sich geht. So entsteht beim Cuticularisierungs- oder Verkorkungsprozeß der Wachsüberzug an der Oberfläche der Pflanzengewebe aus Cellulose (Zucker) nur bei Luftzutritt. So ist ferner der freie Sauerstoff für die Ernährung der niederen Pilze gerade bei sauerstoffreichen Nährstoffen unentbehrlich.“

Die von Naegeli und Loew beschriebenen Versuche an Schimmel weisen einen schließlichen Fettgehalt des Schimmels (Penicillium) von 6 bis 18 % auf.

Einen besonders großen Fettgehalt zeigt der Schimmel im Zustand der „Involution“. Der hierauf bezügliche Versuch sei darum noch speziell erwähnt.

„Um die bei der Involution vor sich gehende Änderung

der Zusammensetzung des Schimmels genauer zu verfolgen, wurde frischer, auf einer aus Eiweiß (1 %) und Zucker (2 %) bestehenden Nährlösung gewachsener Schimmelrasen in kleine Stücke zerschnitten und 3/4 der Masse in verdünnte Phosphorsäurelösung von 1 % Gehalt gelegt, während 1/4 getrocknet und zur Analyse verwendet wurde; letzteres wog 1,456 g. 0,982 g gaben 0,158 g Fettsäure = 16,09 %.

Da diese Fettsäure im wesentlichen Ölsäure ist, so berechnet sich hieraus = 18,50 % neutrales Fett.

0,479 g gaben 0,228 Pt = 6,84 % N.

Nach vier Wochen war der der Involution überlassene Schimmel in eine lockere weiße Masse verwandelt, der frühere kompakte Rasen war in einzelne Fäden zerfallen und hatte nicht unerhebliche Mengen von Stoffen an die Flüssigkeit abgegeben, was aus der Bildung eines neuen Schimmelrasens an der Oberfläche hervorging.

Dieser wurde abgenommen und vom alten Schimmel getrennt; letzterer wurde abfiltriert, gewaschen und getrocknet.

Er wog nur noch 0,7475 g.

0,521 g gaben 0,229 Fettsäure = 43,9 %,
oder 50,54 % neutrales Fett.

0,2265 g gaben 0,043 Pt = 2,69 % N.

Es ergibt sich also hieraus unter Verlust von Eiweiß eine starke Anhäufung von Fett.

Der Schimmel hatte 5/6 seines Gewichtes verloren und zeigte im wesentlichen folgende Zusammensetzung:

	Vor	Nach
	der Involution	
Albumin	42,7	16,5
Fett	18,5	50,5
Cellulose (inkl. Extrakt- u. Mineralstoffe)	38,8	33,0

Das gilt von Schimmel!

Die Hefe ist überhaupt nicht so zur Fettbildung geneigt wie die Schimmelpilze, und es wird ein derart extremer Fettgehalt bei Hefe wohl kaum jemals erreicht werden können; derselbe reicht ja an den Fettgehalt der eigentlichen Ölpflanzen heran, welche bei den Phanerogamen zu suchen sind.

Erdmandeln z. B. enthalten durchschnittlich 51,39 % Fett, die Samen der Ölpalme 47,5 bis 51 %, Leinsamen 20 bis 40 %,

Ölrapssamen bis 49 %, Mohnsamen 40 %, Zirbelkiefersamen 49 %, Fichtensamen 35 % usw.

Bei Kryptogamen bleibt der Fettgehalt meist weit hinter diesen Zahlen zurück.

Doch enthalten manche Sporen große Fettmengen. So enthalten Bärlappsporen (Bärlappsamen) bis zu 50 % Fett[1]).

Pilze bilden bald mehr, bald weniger Fett.

Bei Fäulnispilzen wurden 6 bis 7 % Fett in der Trockensubstanz vorgefunden.

Bei höheren Pilzen ist die Eigenschaft, Fett als Reservenahrung abzulagern in Fruchtkörpern, Dauermycelien, Sklerotien, Sporen, sehr verbreitet.

Fruchtkörper von Pilzen, die gegessen werden, enthalten meist keine großen Fettmengen. So Cantharellus cibarius 1,15 % im Trockengewicht, der Champignon 0,15 % vom Frischgewicht, 0,45 % im Trockengewicht; die Speisemorchel 0,15 % im Frischgewicht, der Steinpilz 1,72 % Fett im Trockengewicht. Das ist kein erheblicher Fettgehalt!

In den untersuchten Meeresalgen ist nur ein geringer Fettgehalt festgestellt worden. Er beträgt $^1/_2$ bis 2 % in der Trockensubstanz.

Bei Flechten wurde ein sehr wechselnder Fettgehalt gefunden, manchmal sehr hoch, so bei der Kalkflechte (Verrucaria calciseda) zu 80 % der Trockensubstanz! Doch bedarf das noch weiterer Untersuchung. Isländisches Moos enthält ca. 1,40 % Fett in der Trockensubstanz.

Unsere Süßwasseralgen enthalten meist auch nicht viel Fett (ausgenommen die mikroskopisch kleinen Diatomeen, die bekanntlich statt Stärke Fett aufspeichern). Verfasser und Loew fanden aber doch bei Spirogyra 8 bis 9 % Fett in der Trockensubstanz vor.

Manche Moosarten haben bei der Untersuchung ansehnliche Fettmengen ergeben, so das Bryum roseum bis zu 18 % Fett.

Was nun das Fett in der Hefe und die praktische Seite dieses Fettgehaltes anlangt, so läßt sich aus dem bisher Mitgeteilten entnehmen, daß von einem Fettreichtum der Hefe

---

[1]) Diese und die folgenden Zahlen sind aus König, Nahrungs- und Genußmittel sowie aus Czapek, Biochemie, entnommen.

nicht gesprochen werden kann, soweit die Handelshefe in ihrem normalen Zustande in Betracht kommt.

Der Fettgehalt derselben bewegt sich in sehr bescheidenen Grenzen.

Eine Steigerung des Fettgehaltes durch bestimmte Ernährungsverhältnisse ist ja wohl durch obige Versuche in einzelnen Fällen konstatiert worden; aber dieselbe ist keine so erhebliche, daß man daraus praktische Gewinnung erhoffen könnte, auch käme das Fett bei dieser Ernährung viel zu teuer.

Es müssen wohl andere Wege eingeschlagen werden als der einer kostspieligen Überernährung der Hefe.

Vielleicht weist uns der oben angeführte Versuch von Naegeli und Loew über die Involution des Schimmelpilzes und die innere Umwandlung, die derselbe hierbei erfährt (Verlust an Eiweiß und starke Fettanhäufung ist zu bemerken), den Weg zur Fetthefe.

Versuche hierüber sind beabsichtigt.

Schlußbemerkung: Es wurde soeben darauf hingewiesen, daß eine Fettbildung in der Hefezelle durch Veränderung des Zellinhaltes ohne äußere Zufuhr geschehen könne. Die oben erwähnten Versuche von Naegeli und Loew, wobei fettreiche Schimmel- oder auch Hefezellen erhalten wurden, waren mit phosphorsäurehaltigem Wasser angestellt. Die Phosphorsäure diente zur Fernhaltung der Bakterien von der Hefe.

Das Auftreten von Fett konnte offenbar nur aus der Umwandlung des Zellinhaltes selbst herstammen.

Welcher Inhaltsstoff mag sich in Fett verwandelt haben?

Damit kommen wir auf die chemischen Vorgänge der Fettbildung.

Es wurde oft behauptet und ist wohl jetzt erwiesen, daß eine Fettbildung aus Eiweiß geschehen könne, ebenso eine Kohlenhydratbildung.

Auf tierphysiologischem Gebiet liegen beweisende Experimente vor.

So haben die Tierphysiologen dargetan, daß im Tierkörper bei reiner Eiweißfütterung Glykogen und Milchzucker auftritt.

Schützenberger hat bei Einwirkung von Ätzbaryt auf Eiweiß unter anderm einen dextrinartigen Körper isoliert.

Die Entstehung von Fettsäuren aus Eiweiß hat man aus

dem vermehrten Fettgehalt der Milch bei reichlicher Eiweißkost geschlossen.

Indirekte Bildung des Fettes aus abgespaltenem Zucker ist weniger wahrscheinlich.

Voit hat die Ansicht vertreten, daß durch Spaltung von Eiweiß im Tierkörper Fett, Harnstoff und Kohlensäure entstehen (als Hauptspaltungsprodukte).

Pflüger hat bei Besprechung der intramolekularen Atmung darauf hingewiesen, daß bei mangelnder Sauerstoffzufuhr eine Eiweißzersetzung unter Bildung von Fett, Kohlensäure und Ammoniak (letzteres mit einem Teile der Kohlensäure zu Harnstoff zusammentretend) anzunehmen sei.

O. Loew nimmt an, daß Teile des Eiweißmoleküles über Leucin als Zwischenstufe in Fett übergehen[1]):

$$
\begin{array}{c}
\text{Komplex in} \\ \text{dem Molekül} \\ \text{des aktiven} \\ \text{Albumins}
\end{array}
\left\{
\begin{array}{ll}
\text{a)} & CHOH - \\
 & \;| \\
\text{b)} & CH - NH \\
 & \;| \\
\text{c)} & C - CHOH \\
 & \;\| \\
\text{d)} & CH \\
 & \;| \\
\text{e)} & CH \cdot NH \\
 & \;| \\
\text{f)} & C - CHOH
\end{array}
\right.
+
\left\{
\begin{array}{l}
H_2O \\ H_2O \\ H_2O
\end{array}
\right.
=
\begin{array}{ll}
COOH & + H \\
\;| & \\
CH - NH_2 & \\
\;| & \\
CH_2 & + CO_2 \\
\;| & \\
CH_2 & \\
\;| & \\
CH_2 & + NH_3 \\
\;| & \\
CH_2 & + CO_2
\end{array}
$$

Bei diesem Prozeß wird Ammoniak und Kohlensäure abgespalten.

Es hat ja die Vorstellung, daß Fett aus dem Protoplasmaeiweiß gebildet wird, gewiß viel für sich. Denn das Eiweißmolekül ist so kompliziert gebaut und mit so verschiedenartigen Atomkomplexen und Atomgruppen versehen, daß auch Fett daraus abgespalten werden kann, ebenso wie Körper, die einer ganz andern Körperklasse als die Fette angehören, Kohlenhydrate.

Wir sehen oft, wie das Protoplasma, wenn es freigelegt wurde, an seiner neuen Oberfläche eine neue Cellulosehaut abscheidet. Derartige Vorgänge sind bei manchen Pflanzenobjekten leicht zu beobachten. Die Hautbildung geht so rasch vor

---

[1]) O. Loew und Th. Bokorny, Chem. Kraftquelle, S. 27 u. 31.

sich, daß man sich des Eindrucks, als sei die Cellulose unmittelbar aus dem Protoplasma entstanden, nicht erwehren kann.

Gewöhnlich nimmt man in pflanzenphysiologischen Kreisen an, daß an der Stelle der Celluloseneubildung Zucker anwesend sei (von selbst oder durch Transport). Dann würde dem Protoplasma nur die Rolle eines synthetisierenden Enzymes zukommen, das die Verwandlung von Zucker in Cellulose bewirkt.

Die chemische Umwandlung, die hierbei vor sich geht, ist nun vielleicht doch keine allzu große, als daß man sie einem Enzym zutrauen könnte.

Anders ist es bei Fett, wenn dasselbe, wie Physiologen annehmen, aus den verschiedenartigsten Stoffen, die von außen zugeführt wurden, gebildet werden kann.

Fett aus Kohlenhydrat!

Das ist eine gewaltige Umwandlung.

$C_6H_{12}O_6$	$C_{16}H_{32}O_2$
Traubenzucker	Fettsäure

Ein synthetisierender und ein weitgehender Reduktionsvorgang zugleich müßte hier Platz greifen.

Wenn Neutralfett gebildet wird, müßte außerdem noch Glycerin erzeugt werden, das sich mit der Fettsäure zu einem Salz verbindet.

$C_6H_{12}O_6$	$C_3H_8O_3$
Traubenzucker	Glycerin

Das wäre ja eine geringere Differenz.

Die Fettsäure müßte mit dem entstandenen Glycerin verbunden werden, was auch für Enzyme erreichbar ist.

Aber die erste Umwandlung, von Traubenzucker zu Fettsäure!

Da nun auch noch andere Ausgangsmaterialien in Betracht kommen als Kohlenhydrate, so dürfte wohl die Annahme, daß zuerst Protoplasmaeiweiß gebildet wird, aus dem die Fettsäure abgespalten wird, manches für sich haben.

Es wurde in den vom Verfasser angestellten Versuchen nur einmal eine nennenswerte Anhäufung von Fett erreicht (Versuch 1, 2 und 3).

Schon der erste Blick auf die Platinschälchen mit dem Fett belehrte mich, daß ein Erfolg vorlag.

Während sonst winzige Tröpfchen Fett bei der Ätherverdunstung zurückblieben, resultierte diesmal eine auffallend größere Menge von Fett. Die Wägung bestätigte das.

Dabei war die Trockensubstanz in diesen Versuchen nicht gestiegen, was wohl auf das Auftreten der rascher wachsenden Bakterien zum Teil zurückzuführen war, die ja immer einen großen Teil der Nahrung vergasen.

Die Untersuchung ergab zum Teil pathologische Hefezellen.

Es scheint demnach der Erfolg dieser Fettbildungsversuche auf einer krankhaften Veränderung der Hefe zu beruhen, die nun zu einer normal nicht auftretenden stärkeren Fettanhäufung in ihren Zellen schritt.

Weitere Versuche über die Fettbildung in der Hefe sind beabsichtigt.

Bemerkt sei nur noch, daß die Temperatur bei all den angeführten Versuchen nur Zimmertemperatur war, ferner daß der Sauerstoff infolge der Gärung ziemlich ausgeschlossen war, was vielleicht ungünstig auf den Fettbildungsprozeß gewirkt hat.

So viel kann immerhin schon jetzt gesagt werden, daß die Hefe kein für Fettbildung recht günstiger Pilz ist.

Leichter und reichlicher kommt eine Anhäufung von Glykogen zustande.

Dasselbe wurde zuerst von Errara[1]) nachgewiesen und später von Cremer[2]), Clautriau usw. studiert. Es vertritt bei den Pilzen die Stärke.

Die Anwesenheit von Glykogen ist z. B. bei reichlicher Zufuhr von Zucker zu konstatieren. Nach Cremer tritt schon 3 bis 4 Stunden nach Darbietung eines geeigneten Kohlenhydrates eine intensive Glykogenspeicherung in der (vorher glykogenfrei gemachten) Hefezelle ein.

Außer Traubenzucker wirkt noch d-Mannose, d-Galaktose und d-Fructose glykogenspeichernd.

Nach E. Laurent wirkt auch Milchzucker glykogenspeichernd.

Auch bei Darbietung von Nichtzuckern wie Glycerin kann nach E. Laurent Glykogen gespeichert werden.

---

[1]) Compt. rend. 101.

[2]) Chem. Ber. 32.

Nimmt während der Gärung der Zuckergehalt bis zu einem gewissen Grade ab, so geht auch der Glykogengehalt herunter [1]), er steigt auf neuen Zuckerzusatz wieder an.

Bei höherer Temperatur tritt das Glykogen schneller auf als bei niederer.

Durch Luftzutritt wird die Glykogenbildung gefördert.

Je weniger sauer die Lösung ist, desto besser geht die Glykogenbildung vor sich (Duclaux).

Wird die Hefe gelagert, so verliert sie Glykogen, besonders bei höherer Temperatur (bei 37° am meisten).

Nach der Natur der Hefe und der Zusammensetzung der Nährlösung wechselt der Glykogengehalt der Hefe stark.

Schönfeld und Krampf fanden in der obergärigen Hefe A der V. L. B. in Berlin 39% Glykogen!

Dagegen enthalten nach Lindner und Henneberg gewisse Heferassen überhaupt kein Glykogen!

Das sind Dinge, die auch bezüglich des Fettgehaltes der Hefe möglicherweise gelten können und jedenfalls bei Untersuchungen über Fett in der Hefe ins Auge gefaßt werden müssen.

Ferner wird angegeben, daß Glykogen- und Eiweißgehalt der Hefe in umgekehrtem Verhältnis stehen.

Das erinnert einigermaßen an den Naegeli-Loewschen Befund, wonach das Eiweiß bei der „Involution" von Pilzen schwindet, während das Fett angehäuft wird.

Man kann in diesem Falle von dem Fett dasselbe behaupten, was von dem Glykogen behauptet wurde, nämlich, daß das Eiweiß abnimmt, wenn das Fett zunimmt.

Untersuchungen über diese wichtigen Dinge sind von hohem Interesse.

Vielfach wird an eine direkte Umwandlung von Kohlenhydrat in Fett geglaubt, was zwar chemisch durchaus nicht wahrscheinlich ist (siehe oben), aber in manchen Beobachtungen eine Stütze findet.

So hat man im Holz der Bäume scheinbar Fettbildung aus Stärke beobachtet.

Wenn der Herbst einsetzt, geht in dem Holze unserer

---

[1]) Euler, Chemie der Hefe, S. 89.

Forst-, Obst- und Zierbäume eine merkwürdige chemische Verwandlung vor sich.

Die Stärke, die bis dahin in den Parenchymzellen des Holzes abgelagert war, um später zum Zellenaufbau in den austreibenden Knospen zu dienen, verwandelt sich allmählich in Fett, wenn man so sagen darf. Faktisch findet man im Spätherbst Fetttropfen an Stelle der Stärke vor. Es soll ja nicht behauptet werden, daß die Umwandlung eine direkte sei.

In diesem fetthaltigen Zustand, der bis Mitte Dezember perfekt geworden ist, verharrt das Holz bis Ende Februar.

Dann beginnt eine Rückverwandlung. An Stelle der Fetttropfen treten dann wieder Kohlenhydrate, die bald eine Wanderung (als Zuckerstoff) zu den austreibenden Knospen und Wurzeln anzutreten haben. Mit dem Frühjahr ist der Fettgehalt des Holzes wieder verschwunden.

Im Winter haben wir also fetthaltiges Holz.

Der Fettgehalt ist freilich recht schwankend je nach der Art des Holzes. Der Wald birgt immerhin in dieser Zeit eine große Menge Fett.

A. Fischer unterscheidet die Fettbäume, wie die Birke, Kiefer, Linde, in denen beträchtliche Fettmengen während des Winters auftreten, von den Stärkebäumen, in denen gegen den Winter zu die Stärke nur wenig schwindet und dem Fette Platz macht. Erstere sind gewöhnlich weichholzig, letztere hartholzig.

Lindenzweige enthalten im Winter in der Trockensubstanz 9 bis 10 % Fett.

Wie das Fett aus den Ölsamen verschwindet, hat J. Sachs bei der Keimung von Cucurbita, deren Kotyledonen hierzu (wie auch die von Helianthus) gute Studienobjekte darstellen, mikroskopisch beobachtet.

Am 4. bis 5. Keimungstage bemerkt man deutliche Veränderungen im Zellinhalte des fettführenden Gewebes.

Das Plasma ist grobschaumig geworden und in seinen Strängen und Platten sind zahlreiche Öltropfen sichtbar.

Es macht den Eindruck, als ob das Fett anfänglich in kolloidaler Lösung im nicht vakuolisierten Plasma vorhanden gewesen wäre und bei Erreichung eines bestimmten Quellungszustandes des Protoplasten eine Entmischung erfolgen würde.

Die Öltropfen nehmen nun an Zahl allmählich deutlich ab, je weiter die Keimung fortschreitet.

Es nimmt also das Fett im keimenden Samen die Form einer Emulsion an.

Das Fett nimmt dabei stetig ab und verschwindet schließlich:

	Fett %
Ricinussamen ungekeimt (nach Maquenne) . .	51,40
" nach 6 Tagen	33,71
" " 10 "	5,74
" " 12 "	6,48
" " 18 "	3,08

Es ist für die Erkenntnis der physiologischen Verwandlungsfähigkeit des Fettes von Belang, daß es Sachs schien, als ob das Fett zuerst kolloidal gelöst gewesen sei im Protoplasma, das dann Öltropfen ausschied. Daß das Fett als solches kolloidal wird und sich auflöst, ist natürlich ausgeschlossen. Es muß eine chemische Umwandlung stattgefunden haben, eine Art Verseifung oder auch eine vorübergehende Umwandlung in Lecithin oder sogar in Protoplasmaeiweiß.

Was den Nachweis und die Bestimmung des Fettes in der Hefe anlangt, so sei noch folgendes bemerkt:

Das übliche Reagens zum qualitativen Nachweis von Fett (Fettsäure) ist die Überosmiumsäure.

Von der Propionsäure an aufwärts scheiden alle Fettsäuren aus 1%iger Überosmiumsäurelösung schwarzes metallisches Osmium ab.

Freilich tun dies auch manche andere in der Zelle vorkommenden Stoffe wie Leucin und Tyrosin, zwei Spaltungsprodukte von Eiweiß.

Hingegen kann man lange Zeit Pepton oder (von Fett und Lecithin befreites) Albumin mit 1%iger Überosmiumsäure erwärmen, ohne daß eine Spur von schwarzem Osmiumniederschlag entsteht.

Man kann auch in dem Farbstoff Sudan III (Amidoazobenzolazo-β-Naphthol), und zwar in alkoholischer Lösung, das Fett erkennen. Die Fetttröpfchen nehmen dabei eine gelbrote bis rote Färbung an, bevor sie sich zu größeren Tropfen vereinigen [1]).

[1]) Euler, Chemie der Hefe, S. 70.

Quantitativ bestimmt man das Fett durch Ätherextraktion und Verdampfen des Äthers, Wägen des Rückstandes. Es ist natürlich nicht ausgeschlossen, daß außer den eigentlichen Fettsubstanzen noch andere hier miterhalten werden, die nicht Fett sind, aber doch in Äther sich lösen.

Nach früheren Angaben ist eine vorherige Zerstörung der Zellenwand der Hefezelle (durch Salzsäure) nötig, um mit Äther alles Fett herausziehen zu können. Wenn man diese Vorsicht außer acht läßt, ist es möglich, daß man nur den dritten Teil des wirklich vorhandenen Fettes erhält.

Um diesen Punkt zu prüfen, wurden zunächst einige Vorversuche gemacht.

3 g an der Luft getrocknete Hefe (aus käuflicher Münchner Brauerei-Preßhefe erhalten) wurden direkt mit Äther extrahiert. Nach dem Eindunsten (bei gew. Temperatur) in einer gewogenen Platinschale ergab sich 0,07 g Fett; das Fett war nahezu geschmacklos, schwach gelblich.

Das macht 2,66 $^0/_0$ Fett in der Trockensubstanz.

Eine nicht große, aber doch innerhalb der gewöhnlichen Grenzen (2 bis 5 $^0/_0$) liegende Fettmenge.

Weitere 3 g derselben Trockenhefe wurden zunächst mit konzentrierter Salzsäure übergossen.

Es stellte sich nach 24 Stunden eine intensive homogene Violettfärbung (von Tryptophan?) ein; die Hefe war in eine dicke, violette Flüssigkeit übergegangen, in der man unter dem Mikroskop keine Hefezellen mehr auffinden konnte; es fanden sich nur noch feinkörnige Reste vor; die Zellmembran war also zerstört.

Nun wurde die Masse mit Äther ausgeschüttelt und mehrere Stunden stehen gelassen, dann wieder geschüttelt. Der Äther setzte sich farblos oben ab. Die Hefemasse wurde steif und schien den Äther wenig eindringen zu lassen.

Tatsächlich ergab der abgegossene Äther beim Eindunsten fast keinen Rückstand. Die Wägung ergab nur 0,02 g Fett.

Das beträgt **0,66** $^0/_0$ Fett in der Trockensubstanz der Hefe.

Da die Hefe von ganz derselben Portion genommen war, mußte hier ein Fehler in der Methode sein, sonst hätte sich dieselbe Fettquantität wie vorhin ergeben.

Noch weniger Fett ergab sich bei einer dritten Fettbe-

stimmung, die an einer neuen, aber auch von derselben Portion Preßhefe stammenden Fettquantität gemacht wurde.

Die Preßhefe wurde diesmal direkt, ohne Trocknung oder sonstige Vorbehandlung, mit Äther ausgeschüttelt.

Es ergab sich nur 0,33 % Fett in der Trockensubstanz.

Da die dickschleimige Beschaffenheit der Masse bei der Salzsäuremethode hinderlich war, wurde noch einmal ein Salzsäureversuch gemacht, bei dem 25 g Preßhefe mit konz. Salzsäure übergossen und dann nach 24 Stunden mit kohlensaurem Natron neutralisiert wurden bis zur kräftigen alkalischen Reaktion. Die nun dünnflüssige Masse sollte auf dem Filter gesammelt, getrocknet und mit Äther ausgezogen werden. Es ergab sich aber ein trübes Filtrat und wenig Rückstand auf dem Filter, so daß von einer Bestimmung des Fettes durch Ätherextraktion der Hefemasse abgesehen werden mußte.

Ein Kontrollversuch, mit ebenfalls 25 g derselben Hefeportion angestellt, wobei die Hefe direkt an der Luft getrocknet und dann mit Äther extrahiert wurde, wurde dann fallen gelassen.

In den vorstehenden Versuchen ist immer nur die Extraktion der Trockenhefe mit Äther angewendet worden.

Emulsin und Myrosin in der Münchener Brauereipreßhefe (zum Teil auch in Getreidepreßhefe).

Von

Th. Bokorny.

(Eingegangen am 15. April 1916.)

Allgemeines über Enzyme.

Daß in der Hefe ein emulsinartiges wie auch ein myrosinartiges Ferment enthalten sei, geht aus folgenden einfachen Versuchen hervor.

Man reibe die Preßhefe (frisch oder trocken) mit Amygdalin einerseits und mit myronsaurem Kali andererseits zusammen, füge so viel Wasser hinzu, daß ein Brei entsteht, und lasse die Mischungen im warmen Zimmer stehen (eventuell geht es auch ohne jeden Wasserzusatz, wenn frische Preßhefe angewandt wird).

Nach 24 bis 48 Stunden beginnt eine Gärung, man bemerkt dann auch den Geruch nach den Spaltungsprodukten (Bittermandelöl, Senföl ...).

Schon die eintretende Gärung allein weist auf die eingetretene Spaltung hin. Denn zur Gärung gehört Zucker, und dieser wird durch die Spaltung frei:

$$\overbrace{\text{Bittermandelöl} + \text{Blausäure} + \text{Traubenzucker}}^{\text{Amygdalin, } C_{20}H_{27}NO_{11}}$$

$$C_6H_5 \cdot CHO + NC \cdot H + C_6H_{12}O_6$$

$$\overbrace{\text{Allylsenföl} + \text{saures K-sulfat} + \text{Traubenzucker}}^{\text{Myronsaures Kali, } C_{10}H_{16}KO_9NS_2 + H_2O}$$

$$SC:N \cdot C_3H_5 + KHSO_4 + C_6H_{12}O_6$$

Ich habe 1 g Amygdalin teils trocken mit 2 g Preßhefe zusammengemischt, teils unter Zusatz von 10, 20 oder 40 ccm Wasser und konnte überall den deutlichsten Bittermandel-

ölgeruch bemerken. Fäulnis trat bei keinem der Versuche ein, offenbar wegen der fäulniswidrigen Beschaffenheit der Spaltungsprodukte, auch nicht binnen 14 Tagen im warmen Zimmer. Myronsaures Kali ergibt unter ähnlichen Verhältnissen Senfölgeruch, auch ohne jegliche Fäulnis.

Nimmt man dasselbe Experiment an Arbutin, Coniferin, Salicin vor, so ereignet sich nichts Bemerkbares und Bemerkenswertes; weder Gärung noch Geruchsentwicklung tritt auf, obwohl überall Traubenzucker bei der Spaltung entsteht.

$$\overbrace{\text{Hydrochinon} + \text{Traubenzucker}}^{\text{Arbutin, } C_{12}H_{16}O_7}$$

$$C_9H_4(OH)_2 (1:4) \qquad C_6H_{12}O_6$$

$$\overbrace{\text{Coniferylalkohol} + \text{Traubenzucker}}^{\text{Coniferin, } C_{16}H_{22}O_8 + 2\,H_2O}$$

$$C_6H_3 \begin{cases} OH_4 \\ OCH_3 3 \\ C_3H_4 \cdot OH_1 \end{cases} \qquad C_6H_2O_6$$

$$\overbrace{\text{Saligenin} + \text{Traubenzucker}}^{\text{Salicin}}$$

$$\text{(Oxybenzylalkohol)} \quad C_6H_{12}O_6$$

$$C_6H_4 \begin{cases} OH \\ CH_2OH. \end{cases}$$

Es tritt offenbar an diesen 3 Glucosiden mit Hefe keine Spaltung ein.

Um die Empfindlichkeit des Emulsins der Hefe zu prüfen, wurden folgende Versuche aufgestellt:

Versuch a (Kontrollversuch).

Hefe (Münchner Brauereipreß-) .	1,0 g
Amygdalin	0,5 „
Wasser	10,0 ccm.

Die Mischung wurde in einem mit Kork verstopften Reagensglas im Zimmer (am Tage warm, nachts kühl) aufgestellt.

Als ich nach 24 Stunden nachsah, war der Stöpsel herausgeschleudert, die Mischung in lebhafter Gärung. Bittermandelölgeruch ließ sich leicht feststellen.

Nach 14 Tagen war der Bittermandelölgeruch noch unver-

mindert zu bemerken. Die Gärung war längst beendet, über der Hefe stand eine klare Flüssigkeit.

Die verwendete Hefe hatte also offenbar eine Spaltung des Amygdalins und dann Vergärung des freigewordenen Traubenzuckers bewirkt.

Daß dies nicht etwa das Werk von Bakterien[1]) gewesen ist, dafür spricht die relative Reinheit der angewandten Preßhefe, ferner die Kürze der Versuchszeit bis zum Eintritt der Gärung und des Geruches, endlich die alkoholische Gärung und ihre antibakterielle Wirkung.

Versuch b.

Hefe (Brauereipreß-)	1,0 g
Amygdalin	0,5 „
Schwefelsäure von 0,1 % . .	10,0 ccm.

Auch hier trat sehr lebhafte Gärung ein, die den Stöpsel herausschleuderte. Bittermandelölgeruch war deutlich zu konstatieren.

Nach 14 Tagen war der Bittermandelölgeruch ebenso zu bemerken. Die Gärung war beendet, die Hefe abgesetzt, Flüssigkeit klar.

0,1 % Schwefelsäure ist also, auch bei andauernder Anwesenheit neben und in der Hefe, nicht imstande, die Emulsinwirkung unmöglich zu machen.

Das Emulsin wird also durch 0,1 % Schwefelsäure nicht abgetötet.

Versuch c.

Hefe (Brauereipreß-)	1,0 g
Amygdalin	0,5 „
Schwefelsäure von 0,5 % . .	10,0 ccm.

Die Gärung trat nur schwach ein. Bittermandelölgeruch nur anfangs etwas, nach 5 Tagen nicht mehr.

Nach 14 Tagen kaum Spuren eines Bittermandelölgeruches.

Offenbar wird das Hefeemulsin durch 0,5 %ige Schwefelsäure getötet.

---

[1]) Fäulnis trat auch nach wochenlangem Stehen nicht auf, offenbar wegen der antibakteriellen Wirkung des Bittermandelöls und der Blausäure.

Das ist kein ganz unerwartetes Resultat.

Denn schon 0,135 %ige Salzsäure hebt die Wirkung des Mandelemulsins binnen 1/2 Stunde völlig auf.

0,1 % Salzsäure macht die Malzdiastase bei 40° binnen wenigen Stunden unwirksam (hier ist allerdings die relativ hohe Temperatur 40° noch behilflich bei der schädlichen Wirkung des Fermentes). 0,5 % Schwefelsäure tötet die Zymase usw.

Versuch d.

Hefe (Brauereipreß-)	1,0 g
Amygdalin	0,5 „
Schwefelsäure von 1 % . . .	10,0 ccm.

Die Gärung trat hier gar nicht ein (obwohl die Hefe lange Zeit mit der amygdalinhaltigen Flüssigkeit in Berührung gelassen wurde).

Kein Bittermandelölgeruch.

Nach 14 Tagen ebenfalls kein Bittermandelölgeruch.

Auch durch 1 %ige Schwefelsäure wird das Hefe-Emulsin getötet, was ja nach dem vorausgehenden Versuch nicht mehr zweifelhaft war.

Versuch d wäre nicht aufgestellt worden, wenn das Resultat des Versuches c schon vorher bekannt gewesen wäre.

Was den Versuch b mit 0,1 %iger Schwefelsäure anlangt, so könnte ein Zweifel aufsteigen, ob denn die angewandte Schwefelsäuremenge quantitativ ausreichend war, um Hefe und Ferment zu töten, wenn eine schädliche Wirkung bei solcher Verdünnung noch zustande kam.

Aus meinen quantitativen Versuchen (über Trennung von Leben und Gärkraft in der Hefe)[1]) wissen wir, daß 3 ccm einer 0,5 %igen Schwefelsäure ausreichen, um Hefe und Ferment abzutöten in 2 g Hefe (von 30 % Tr.-S.).

Es würden 1,5 ccm einer 0,5 %igen Schwefelsäure reichen für 1 g Preßhefe.

7,5 ccm einer 0,1 %igen Schwefelsäure mußten ausreichen für 1 g Preßhefe.

Da nun tatsächlich 10 ccm einer 0,1 %igen Schwefelsäure

---

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. **114**.

angewandt wurden, so kann über das event. Ausreichen dieser Giftmenge kein Zweifel obwalten.

Der Versuch b hat faktisch nur deswegen positives Resultat ergeben, weil die Verdünnung 0,1 % zu gering ist für eine tödliche Einwirkung.

Über die Wirkung der Temperatur wurden folgende Versuche angestellt:

Versuch e.

Hefe (Getreidepreß-)	1,0 g
Amygdalin	0,5 „
Wasser von Temperatur 100° .	25,0 ccm.

Durch eine so hohe Temperatur werden die meisten Enzyme getötet.

Es war also auch hier ein negatives Resultat zu erwarten.

Faktisch ergab sich bei Zusatz von Amygdalin zu dem Versuch weder nach 24 Stunden, noch nach 48 Stunden oder nach 3 Tagen eine Spur von Gärung oder von Bittermandelölgeruch.

Das Ferment Hefeemulsin wird also durch 100° feuchte Hitze getötet.

Versuch f.

Hefe (Getreidepreß-)	1,0 g
Amygdalin	0,5 „
Wasser von Temperatur 80° .	25,0 ccm.

Ähnlich wie bei Versuch e war das Resultat auch hier.

Weder Gärung noch Bittermandelölgeruch wurde binnen 3 Tagen erhalten.

Es ist also auch 80° feuchte Hitze für das Hefemyrosin tödlich. Auch das war zu erwarten.

Versuch g.

Hefe (Getreidepreß-)	1,0 g
Amygdalin	0,5 „
Wasser von Temperatur 50° .	25,0 ccm.

In den Arbeiten über Mandelemulsin wird die tödliche Temperatur zu 70° angegeben.

Es stand also einigermaßen zu erwarten, daß hier ein positives Resultat hervorkommen werde.

Das war aber nicht der Fall.

Weder nach 1, noch nach 2, noch nach 3 oder 4 Tagen war eine Spur von Gärung oder von Bittermandelölgeruch zu bemerken.

Somit erträgt das Hefeemulsin nicht einmal eine feuchte Hitze von 50° (5 Minuten lang).

Versuch h (Kontrollversuch).

Hefe (Getreidepreß-) . . . . . 1,0 g
Amygdalin . . . . 0,5 "
Wasser von Temperatur 20° . 25,0 ccm.

Hier endlich wurde ein positives Resultat erhalten.

Freilich trat der Bittermandelölgeruch nach 24 Stunden erst recht schwach hervor; besser nach 2 und nach 3 Tagen.

Offenbar enthält die Getreidepreßhefe nicht so viel Emulsin wie die Brauereipreßhefe.

Folgende Versuche wurden dann noch über die Wirkung der Essigsäure auf das Hefeemulsin angestellt:

Versuch i.

Hefe (Getreidepreß-) . . . . . 1,0 g
Amygdalin . . . . 0,5 " (erst nach 24 Std. zugesetzt)
Dest. Wasser von Temperatur 20° 25,0 ccm
Essigsäure . . . . 1,25 g d. i. 5 % (nach 24 Std. abfiltriert und durch aq. dest. ersetzt).
Dest. Wasser von Temperatur 20° 25,0 ccm.

Nachdem die Essigsäure 24 Stunden lang auf die Hefe gewirkt hatte, wurde die Hefe ausgewaschen, damit von der anhängenden Säure befreit und nun mit reinem Wasser und Amygdalin versetzt.

Es zeigte sich nach 24 bis 72 Stunden keine Spur von Gärung und von Bittermandelölgeruch. Die Essigsäure von 5 % hatte also das Hefeemulsin unwirksam gemacht.

Versuch k.

Amygdalin . . . . 0,5 g (erst nach 24 Std. zugesetzt)
Dest. Wasser von 20° 25,0 ccm
Hefe (Getreidepreß-) 1,0 g
Essigsäure . . . . 0,20 " d. i. 1 % (nach 24 Std. ausgewaschen und durch Wasser ersetzt)

Bei gleichem Verfahren wie bei Versuch i erfolgte weder Gärung noch Auftreten von Bittermandelölgeruch.

Also war das Hefeemulsin durch 1 % Essigsäure unwirksam geworden.

Daß eine Gärung auftreten würde, war selbst im Falle der Spaltung des Amygdalins bei Versuch i gar nicht, bei Versuch k nur wenig anzunehmen, da 5 % Essigsäure die Zymase tötet, 1 % schädigt.

Versuch l.

Hefe (Getreidepreß-) . 1,0 g
Amygdalin . . . . . 0,5 „ (erst nach 24 Std. zugesetzt)
Dest. Wasser von 20° 25,0 ccm
Essigsäure . . . . 0,125 g d.i. 0,5 % (nach 24 Std. ausgewaschen und durch Wasser ersetzt).

Als die Essigsäure nach 24 Stunden weggewaschen und durch amygdalinhaltiges Wasser ersetzt war, trat binnen 4 Tagen kaum eine Spur von Bittermandelölgeruch oder Gärung auf.

Man kann sagen, daß die 0,5 % Essigsäure binnen 24 Stunden das Hefeemulsin unwirksam macht.

Dasselbe ist gegen Essigsäure relativ stark empfindlich.

Versuch m.

Hefe (Getreidepreß-) . 1,0 g
Amygdalin . . . . . 0,5 g (erst nach 24 Std. zugesetzt)
Destilliertes Wasser . 50,0 g
Alkohol . . . . . 50,0 g (50 %iger Alkohol also, der nach 24 Std. weggegossen und durch amygdalinhaltiges Wasser ersetzt wurde).

Bei 2 tägigem Stehen in Zimmertemperatur entwickelt sich ein ausgesprochener Bittermandelölgeruch; also war Amygdalinspaltung eingetreten. Gärung war nicht eingetreten, vermutlich wegen der Gegenwart von soviel Alkohol.

Man kann also sagen, daß das Hefeemulsin durch 50 %igen Alkohol nicht unwirksam gemacht wird.

Versuch n.

Hefe (Getreidepreß-) . 1,0 g
Amygdalin . . . . . 0,5 g (erst nach 24 Std. mit dem Wasser zugesetzt)

Alkohol abs. . . . 50,0 g (100%iger Alkohol also, der nach 24 Std. durch 50 ccm amygdalinhaltigen Wassers ersetzt wurde).

Nach 2 tägigem Stehen der Hefe mit der reinen Amygdalinlösung war etwas von Bittermandelölgeruch zu erkennen; keine Gärung, wie wohl begreiflich.

100%iger Alkohol tötet das Hefeemulsin wie auch viele andere Fermente, aber nicht sogleich vollständig. Denn der Bittermandelölgeruch war nach 2 Tagen schwach zu erkennen. 24 stündige Einwirkung des absoluten Alkohols hatte nicht völlig ausgereicht.

Versuch o.

Hefe . . . . 1,0 g
Amygdalin . . . . 0,5 g (erst nach 24 Std. nach Auswaschen des CH_2O zugegeben)
0,5%iger Formaldehyd 25,0 ccm (nach 24 Std. durch Aq. dest. mit Amygdalin ersetzt).

Nach 8 tägigem Stehen des Versuches war kein Bittermandelölgeruch wahrzunehmen.

Der 0,5%ige Formaldehyd hatte also das Hefeemulsin unwirksam gemacht.

Es stimmt das mit den Beobachtungen an anderen Enzymen überein, wobei Formaldehyd von dieser Konzentration meist als vernichtend gefunden wurde.

Versuch p.

Hefe . . . . 1,0 g
Amygdalin . . . . 0,5 g (erst nach 24 Std., d. i. nach Auswaschen des Formaldehyds, zugegeben)
0,2%iger Formaldehyd 50,0 ccm (nach 24 Std. entfernt und durch Aq. dest. mit Amygdalin ersetzt).

Nach 8 tägigem Stehen schien es mir, als ob ganz schwacher Bittermandelölgeruch vorhanden sei. Doch war es zweifelhaft.

Jedenfalls läßt 0,2% Formaldehyd bei 24 stündiger Einwirkung kaum Spuren von der Wirksamkeit des Hefeemulsins übrig.

Versuch q.

Hefe . . . . 1,0 g
Amygdalin . . . . 0,5 g (erst nach dem Auswaschen des Formaldehyds zugesetzt)
0,1 %iger Formaldehyd 50,0 ccm (nach 24 Std. entfernt und durch Aq. dest. mit Amygdalin ersetzt).

Auch hier war es nach 8 Tagen recht zweifelhaft, ob das Hefeemulsin gewirkt hatte. Es waren kaum Spuren von Bittermandelöl wahrzunehmen.

Versuch r (Kontrollversuch zu o mit q).

Hefe . . . . 1,0 g
Amygdalin . . . . . 0,5 g
Aq. dest. . . . . . . 50,0 ccm

Nach 8 tägigem Stehen des Versuches war ein sehr ausgesprochener Bittermandelölgeruch wahrzunehmen.

Versuch s.

Hefe (Bier-) . . . . 1,0 g
Amygdalin . . . . 0,5 g (erst nach dem Auswaschen des Sublimates mit 10 ccm Aq. dest. zugesetzt)
Sublimat 0,02 %ige Lösung 500,0 ccm (nach 24 Std. ausgewaschen).

Als die Mischung nach 4 tägigem Stehen untersucht wurde, ergab sich, daß kein Bittermandelöl aufgetreten war.

0,02 % Sublimat hatte also das Hefeemulsin unwirksam gemacht.

Es ist das eine auffallend große Empfindlichkeit gegen Sublimat.

Denn nur bei Zymase reicht diese geringe Konzentration zur Abtötung des Fermentes aus, ferner auch bei der Hefemaltase.

Hingegen wird die Hefeinvertase sogar durch 0,1 % noch nicht ganz vernichtet.

Für Hefekatalase ist 0,1 % nur schädlich.

Versuch t.

Hefe (Bier-)	1,0 g
Amygdalin	0,5 g
Sublimat 0,1 %ige Lösung .	100,0 ccm

Da schon 0,02 % tödlich wirkt, war anzunehmen, daß auch 0,1 % das Hefeemulsin unwirksam machen werde.

Das war auch der Fall. Es war nach 4 Tagen kein Bittermandelölgeruch wahrzunehmen.

Es würde der Versuch überhaupt nicht aufgestellt worden sein, wenn das Resultat von Versuch s schon vorher bekannt gewesen wäre.

Kontrollversuch zu s bis v.

Hefe (Bier-) . .	1,0 g
Aq. dest. . . .	1,0 ccm
Amygdalin . .	0,5 g

Nach 4 Tagen war deutlicher Bittermandelölgeruch wahrzunehmen.

Der Geruch war allerdings nicht so stark wie in manchen anderen Kontrollversuchen.

Es scheint mir, daß die diesmal angewendete Hefe nicht so reich an Emulsin gewesen sei wie andere Proben.

Nach den bisherigen Beobachtungen schwankt der Emulsingehalt der Hefe ziemlich stark.

Versuch u.

Hefe (Bier-)	1,0 g
Amygdalin	0,5 g
Kupfervitriol 0,02 %ige Lösung .	500,0 ccm

Nach 4 Tagen war kein Bittermandelölgeruch wahrzunehmen.

Kupfervitriol ist auch sonst als starkes Ferment- und Plasmagift bekannt.

So tötet schon 0,01 % Kupfervitriol die Zymase binnen 24 Stunden.

Bei Zellen genügen oft noch geringere Konzentrationen, um eine schädliche, ja sogar tödliche Wirkung herbeizuführen.

Ich habe bei Spirogyren festgestellt, daß 1 : 1 Million genügt, um den Zellentod zu bewirken.

Versuch v.

Hefe (Bier-)	1,0 g
Amygdalin	0,5 g
Kupfervitriol 0,1 $^0/_0$ige Lösung . .	100,0 ccm

Nach 4 Tagen war kein Bittermandelölgeruch wahrzu nehmen.

Das war ja auch nach Untersuchung von Versuch u vorauszusehen.

Aus den wenigen bis jetzt angestellten Versuchen über das Hefeemulsin geht hervor, daß dasselbe zu den empfindlicheren Enzymen gehört. Nur gegen Alkohol ist es wenig empfindlich, denn selbst absoluter (96 $^0/_0$iger) Alkohol tötet binnen 24 Stunden nicht ganz vollständig.

Da der Alkohol austrocknend (außerdem aber auch giftig) wirkt, wurde noch ein Versuch mit lufttrockner Hefe und Amygdalin angestellt. Bei Zusatz von 10 ccm Wasser zu 0,5 g Trockenhefe und 0,25 g Amygdalin trat binnen 36 Stunden ein intensiver Bittermandelölgeruch auf. Also wird das Hefeemulsin durch völliges Austrocknen der Hefe an der Luft (bei gew. Temp.) nicht getötet.

Infolge der Unempfindlichkeit des Hefeemulsins kann man die Versuche über dieses Ferment bequem auch mit Trockenhefe machen, die man sich selbst hergestellt hat. Wie lange das Emulsin und Myrosin in dieser äußersten Falles aushält, habe ich freilich nicht festgestellt. Jedenfalls aber kann man einige Wochen mit selbsthergestellter Trockenhefe unbedenklich experimentieren.

Versuch x.

Lufttrockne Hefe . .	1,5 g	
Aceton von 100 $^0/_0$.	5,0 ccm	(nach 5 Minuten entfernt)
Myronsaures Kali . .	0,5 g	(erst nach dem Entfernen von Aceton zugesetzt)
Wasser	10,0 ccm	(nach Entfernung des Acetons zugesetzt).

Die Hefe wurde, nachdem das Aceton nach Ablauf von 5 Minuten entfernt war, mit 10 ccm Wasser und 0,5 g myronsaurem Kali versetzt, es trat binnen 24 Stunden und auch binnen 3 Tagen deutlicher Senfölgeruch auf.

Also tötet Aceton binnen 5 Minuten nicht (auch die Zymase nicht, siehe „Acetonhefe").

Derselbe Versuch wurde dann unter 24 stündiger Einwirkung des Acetons nochmals gemacht.

Nach dem Abgießen und Auswaschen des Acetons trat bei Zusatz von Wasser (10 ccm) und Amygdalin 0,5 g kein Senfölgeruch mehr auf, auch nicht bei längerem Zuwarten.

Und auch binnen 3 Tagen war nichts von einer Zersetzung des myronsauren Kaliums wahrzunehmen. Also hatte die 24-stündige Behandlung der Trockenhefe mit Aceton ausgereicht, um das Myrosin zu vernichten.

Eine Reihe von den obigen ganz ähnlichen Versuchen wurden dann auch noch weiter über das Hefemyrosin angestellt.

Zunächst einer über die Wirkung des Austrocknens.

Denn erstens wollte ich mit Trockenhefe arbeiten, weil dabei die Hefe länger verwendungsfähig bleibt und nicht immer wieder frisch gekauft werden muß.

Versuch aa (Kontrollversuch).

Lufttrockne Hefe (Getreidepreßhefe)	1,0 g
Myronsaures Kali	5,5 g
Wasser	10,0 ccm

Schon nach 12 Stunden zeigte sich deutlicher Geruch nach Senföl.

Also war wirksames Myrosin in der Trockenhefe vorhanden und hatte auf das zugesetzte myronsaure Kali spaltend eingewirkt.

Versuch bb.

Hefe	1,0 g
Myronsaures Kali	0,5 g
1%ige Schwefelsäure . .	10,0 ccm

Kein Senfölgeruch nach 24 Stunden, auch nicht nach 4 Tagen.

1%ige Schwefelsäure ist also imstande, die Wirkung des Myrosins aufzuheben, das Myrosin zu vernichten.

Darin gleicht das Hefemyrosin vielen anderen Enzymen.

Versuch cc.

Hefe	1,0 g
Myronsaures Kali	0,5 g
0,5 $^0/_0$ige Schwefelsäure .	10,0 ccm

Kein Senfölgeruch nach 24 Stunden, auch nicht nach 4 Tagen.

Sogar 0,5 $^0/_0$ige Schwefelsäure ist demnach schädlich genug, um die Fermentkraft des Myrosins zu zerstören.

Damit erweist sich das Myrosin der Hefe als stark säureempfindlich.

Versuch dd.

Hefe	1,0 g
Myronsaures Kali	0,5 g
0,1 $^0/_0$ige Schwefelsäure .	10,0 ccm

Kein Senfölgeruch nach 24 Stunden. Nach 4 Tagen ganz schwache Anfänge zu erkennen.

Offenbar liegt bei 0,1 $^0/_0$ die Grenze der Giftigkeit von Schwefelsäure gegen das Hefemyrosin.

So stark säureempfindliche Enzyme dürfte es wohl wenige geben.

Versuch ee.

Trockenhefe (Getreidepreßhefe) .	1,0 g
Myronsaures Kali	0,2 g
1 $^0/_0$ige Natronlauge	10,0 ccm

Kein Senfölgeruch, weder nach 24 Stunden noch nach 4 Tagen. Das stimmt überein mit dem, was man sonst über die Wirkung der Natronlauge auf Fermente weiß.

1 $^0/_0$ige Lauge tötet wohl die meisten Fermente, wenn nicht alle.

Für das Protoplasma sind schon weit geringere Konzentrationen tödlich.

Reine Ammoniaklösung tötet Zellen noch bei 0,05 $^0/_0$.

Versuch ff.

Trockenhefe (Getreide-)	1,0 g
Myronsaures Kali	0,2 g
0,5 $^0/_0$ige Natronlauge . . .	10,0 ccm

Kein Senfölgeruch, weder nach 24 Stunden noch nach 4 Tagen.

Hier trat nach 4 Tagen Fäulnis ein.

Das letztere ist nur so zu erklären, daß die Natronlauge von der Hefe zum Teil gebunden und damit so verdünnt wurde, daß eine Entwicklung von Bakterien eintreten konnte. Sonst wäre natürlich die Bakterienvegetation ausgeschlossen gewesen.

Versuch gg.

Trockenhefe	0,5 g
0,5 %iger Formaldehyd . .	20,0 ccm
Myronsaures Kali	0,2 g

Kein Senfölgeruch, weder nach 24 Stunden noch nach 3 Tagen.

Das Hefemyrosin scheint etwas empfindlicher gegen Formaldehyd zu sein als das Myrosin des Senfes.

Denn dieses wird wohl durch 5 %igen Formaldehyd binnen 24 Stunden getötet, nicht aber durch 1 %igen!

Es gibt sogar noch unempfindlichere Fermente. Invertase wird durch 5 % nicht zerstört.

Versuch hh.

Trockenhefe	0,5 g
0,2 %iger Formaldehyd . .	20,0 ccm
Myronsaures Kali	0,2 g

Kein Senfölgeruch nach 24 Stunden. Nach 3 Tagen war aber etwas Senfölgeruch zu bemerken.

Hier scheint also die Grenze zu liegen, bei welcher der Formaldehyd noch nicht ganz vernichtet wird.

Die Zymase wird durch 0,2 %igen Formaldehyd binnen 24 Stunden vernichtet, ist also noch empfindlicher gegen Formaldehyd.

Versuch ii.

Trockenhefe	0,5 g
0,1 %iger Formaldehyd . .	20,0 ccm
Myronsaures Kali	0,2 g

Hier trat nach 2 Tagen etwas Senfölgeruch auf.

Die geringe Entwicklung von Senfölgeruch läßt schließen, daß auch hier schon eine Schädigung des Fermentes stattgefunden hat.

Im ganzen läßt sich sagen, daß dem Hefemyrosin eine ziemlich große Empfindlichkeit gegen Formaldehyd zukommt.

Da auch bei anderen Giften eine relativ große Empfindlichkeit des Hefemyrosins konstatiert wurde, darf man es zu den empfindlicheren Enzymen rechnen.

Auch gegenüber dem Senfmyrosin erscheint es wesentlich empfindlicher gegen Gifte.

Versuch kk.

Trockenhefe	0,5 g
0,02 $^0/_0$ige Sublimatlösung .	50,0 ccm
Myronsaures Kali	0,2 g

Nach 24 Stunden wurde die Sublimatlösung abgegossen und 10 ccm Wasser mit 0,2 g myronsaurem Kali aufgegeben.

Es stellte sich nach weiteren 24 Stunden kein Senfölgeruch ein.

Ebenso auch nicht nach 3 Tagen.

Das Sublimat bewährt sich also auch hier als eines der stärksten Enzymgifte.

Versuch ll.

Hefe (trocken) . . .	1 g	
Alkohol absol. . . .	20 ccm	(nach 12 Stunden entfernt und durch 10 ccm einer 2 $^0/_0$igen myronsauren Kalilösung ersetzt).

Nach 12 Stunden wurde die Hefe mit Wasser ausgewaschen und nun mit 10 ccm Wasser und 0,2 g myronsaurem Kali versetzt.

Nach weiteren 24 Stunden deutlicher Senfölgeruch.

Also hatte der absolute Alkohol sogar bei 12stündiger Einwirkung nicht ausgereicht, um die Fermentkraft des Hefemyrosins zu vernichten.

Gegen Alkohol ist somit das Hefemyrosin viel weniger empfindlich als manche andere Enzyme.

So wird die Zymase durch 50 $^0/_0$igen Alkohol binnen 24 Stunden vernichtet.

Ebenso die Maltase.

Versuch mm.

(Wird Myrosin und Emulsin mit Wasser aus trockener Hefe extrahiert?)

Hefe (trocken) . . . . . . 10 g
Wasser (dest.) . . . . . . 50 g

Nach 24stündigem Stehen wurde die eine Hälfte des filtrierten Hefewassers mit 0,5 g Amygdalin, die andere mit 0,5 g myrosinsaurem Kali versetzt. Beide Lösungen wurden dann einige Tage bei 18° stehen gelassen.

Es trat weder Senföl- noch Bittermandelölgeruch auf.

Also sind die Enzyme Myrosin und Emulsin aus trockener Preßhefe nicht mit Wasser extrahierbar. Wenigstens konnte ich binnen 24 Stunden keine nachweisbare Quantität Ferment in dem Extrakt erhalten. Der letztere vermochte auch bei tagelangem Stehen keine Spur von Bittermandelöl aus Amygdalin oder Senföl aus myronsaurem Kali zu entwickeln, während die trockene Hefe selbst das binnen 12 Stunden tat.

In der trockenen Hefe sind außerdem noch andere wirksame Enzyme enthalten.

So die Invertase, die nach dem Trocknen aus der Hefe extrahiert werden kann.

Aus den Kefirkörnern kann mit Wasser wirksame Lactase extrahiert werden.

Die Carboxylase, die nach Neuberg und Karczag[1]) aus gewissen Carbonsäuren Kohlensäure abspaltet, ist in der Acetondauerhefe „Hefanol“ nachgewiesen worden.

Trypsin und Pepsin sind in der trocknen Hefe noch wirksam enthalten. Man kann durch Zumischung von trockner Hefe zu Fleisch oder anderem eiweißhaltigen Material eine beträchtliche Eiweißverdauung erhalten; freilich der größere Teil bleibt unverdaut (unlöslich).

Warum das Myrosin und Emulsin aus Hefe nach dem Trocknen nicht mit Wasser extrahiert werden, liegt vielleicht in der geringen Löslichkeit derselben.

Aus dem Verhalten der trocknen Hefe gegen Amygdalin und myronsaures Kali läßt sich ohne weiteres erkennen, daß

---

[1]) Diese Zeitschr. 36.

diese Fähigkeit, Bittermandelöl bzw. Senföl abzuspalten, durchaus nicht dem lebenden Hefeprotoplasma selbst zugeschrieben werden darf, denn durch das Austrocknen stirbt dieses ab.

Auch geht dies noch aus dem Verhalten der Hefe gegen verschiedene Gifte in schwächerer Auflösung hervor, wobei die Hefe abstirbt, ihre Fermentkraft aber noch behält.

Wieviel Emulsin und Myrosin ist in der Hefe enthalten?

Das läßt sich prozentisch oder absolut ebensowenig angeben, wie es bei anderen Fermenten gesagt werden kann.

Denn es fehlt das Kriterium dafür, wann ein Ferment „rein“ vorliegt.

Wir können höchstens mit anderen Pflanzen vergleichen, z. B. die Hefe mit dem Senfsamen.

Da muß nun allerdings gesagt werden, daß ein großer Unterschied besteht.

Der zerriebene Senfsame gibt die Senfölreaktion viel rascher und stärker als die Hefe. Ähnlich dürfte es sich mit dem Emulsin verhalten.

Wir können wohl sagen, daß der Gehalt der Hefe an Emulsin und Myrosin relativ gering ist.

Das mag auch die Ursache sein, warum diese Fermente der Hefe bis jetzt unbekannt geblieben sind.

Immerhin müssen solche Fermente da sein, da, wie oben hervorgehoben, auch tote Hefe, wenn die Fermente geschont wurden, jene Fähigkeit, myronsaures Kali und Amygdalin zu spalten, besitzt.

Es fragt sich höchstens, ob nicht irgendeines der bis jetzt bekannten (anderen) Hefefermente dieses Vermögen in sich hat.

Doch ist darüber nichts bekannt geworden.

Wir sind berechtigt, von einem Hefeemulsin und Hefemyrosin zu sprechen.

In diesem Sinne wird die Amygdalinspaltung durch Hefe auch von Henry und Auld aufgefaßt[1]). Von der Spaltung des myronsauren Kaliums berichten dieselben nichts, soweit ich aus dem Zitat in Oppenheimer, Fermente I, S. 245, ersehen kann.

---

[1]) On the probable exist. of emulsin in yeast. Proc. R. Society, Ser. 13, 76.

„Sehr interessant ist, daß Henry und Auld eine Zerlegung von Amygdalin durch Hefe und Preßsäfte, sowie Acetondauerhefe beobachtet haben, wobei nicht Mandelnitrilglucosid, sondern ganz typisch Blausäure, Benzaldehyd sowie Alkohol und Kohlensäure entstehen. Es ist auch nach dem Zerstören der Zymase durch 58^0 noch wirksam, wobei natürlich der entstandene Traubenzucker intakt bleibt, spaltet auch Salizin usw. und Mandelnitrilglucosid. Es scheint sich also tatsächlich um das typische β-Ferment des Emulsins neben der in den Hefen vorhandenen Amygdalase (die ein in bittern Mandeln enthaltenes Disaccharid Amygdalase in 2 Mol. Glucose spaltet) zu handeln.

Das Emulsin der Mandeln wird gegenwärtig als ein Gemisch mehrerer Fermente angesehen.

Die Amygdalinspaltung in Benzaldehyd, Blausäure und Glucose ist ein komplizierter, von mehreren meist nebeneinander gegebenen Fermenten bewirkter Vorgang:

a) Die β-Glucosidase oder Prunase ist ein β-Ferment, wohl identisch mit dem Prinzip des Emulsins, das β-Methylglucosid spaltet; es löst die eigentliche Glucosidbindung zwischen dem Zucker und dem aromatischen Rest.

b) Ein α-Ferment Amygdalase, daß die Biose des Amygdalins in 2 Mol. Glucose spaltet.

c) Ein Ferment, das die Bindung des Oxinitrils löst, die Oxynitrilase oder Benzcyanase.

In der Münchner Bierhefe wie auch in der Getreidepreßhefe sind offenbar alle drei Fermente nebeneinander vorhanden, ebenso wie in den bittern Mandeln.

Das „Emulsin“ ist bei zahlreichen Pflanzenorganen gefunden worden, außer in Mandeln auch in Äpfel- und Birnsamen, Polygala, Ribes, Lathraea, Orchideen, Gräsern usw.

Von Kryptogamen wird bei Aspergillus niger und Penicillium glaucum über das Vorkommen von Emulsin berichtet, ferner bei holzbewohnenden Pilzen, dann bei Agaricus campestris, in Moosen und Flechten.

Auch Bakterien sollen emulsinähnliche Fermente besitzen, sie spalten Amygdalin unter Entstehung von Benzaldehyd, doch ist Glucose nicht nachweisbar.

Interessant wäre es, auch die synthetische Wirkung des Hefeemulsins zu prüfen.

Die Synthese der Glucoside durch Mandelemulsin wurde von van t'Hoff am Glyceringlucosid nachgewiesen. Es können bis 70 % Glucosid entstehen, 5 % pro Tag. Es wurde Glucose, Glycerin und Wasser im Verhältnis 2 : 4 : 1 gemischt.

Bezüglich des Myrosins gibt Oppenheimer an (a. a. O. S. 260), daß dasselbe ganz eigenartig sei und von allen andern sich unterscheide.

Es soll sich ausschließlich in höheren Pflanzen finden, sonst nirgends, auch nicht in den Bakterien.

Das ist nicht richtig.

Das Myrosin findet sich zweifellos in der Hefe vor.

Allgemeine Betrachtungen.

Ungemein verschieden stellt sich die Empfindlichkeit der Enzyme gegen verschiedene chemische Agenzien dar.

Dasselbe bemerken wir übrigens auch bei andern schädlichen Einwirkungen, z. B. beim Austrocknen, beim Erhitzen.

Trocknet man Hefe durch Ausbreiten auf einem Fließpapier an der Luft, so kann man sich bezüglich der Invertase leicht überzeugen, daß sie in getrockneter Hefe noch ebenso wirksam ist wie in frischer. Man braucht nur die Trockenhefe in Rohrzuckerlösung zu bringen. Schon nach 1 Minute langem Stehen gelingt die Fehlingsche Reaktion.

Anders bei der Maltase. Sie wird durch das Trocknen unwirksam.

Versetzt man die Trockenhefe in Maltoselösung und wartet man selbst 24 Stunden, so ergibt die Lösung beim Kochen mit schwach saurer Lösung von Kupferacetat keine Abscheidung von rotem Kupferoxydul.

Mit frischer Hefe versetzt, ergibt Malzzuckerlösung fast augenblicklich die Reduktionsprobe.

Wie sich die diastatische Fermentwirkung der Hefe verhält, wenn man sie austrocknet, wurde durch folgenden Versuch zu ermitteln versucht.

Getrocknete, steinharte Hefe wurde mit Wasser zerrieben und dann mit Stärke verschiedener Herkunft (meist aus Cerealien) vermischt. Zwar enthält die Preßhefe schon von Haus aus Stärkekörner, dieselben sind aber Kartoffelstärke, die als

schwerer angreifbar durch diastatische Fermente geschildert wird; darum wurde andere Stärke zugesetzt.

Der Versuch wurde 24 Stunden im Brutofen bei 35° stehen gelassen.

Die darauf folgende mikroskopische Untersuchung ergab, daß eine Korrosion ziemlich vieler Stärkekörner stattgefunden hatte. Es war also ein diastatisches Ferment in Wirkung getreten; dasselbe war beim Trocknen der Hefe wirksam geblieben.

Malzdiastase wird faktisch aus Malz isoliert und als trocknes Präparat in den Handel gebracht; trocken soll es sogar eine Erhitzung auf 100° ertragen.

Um das tryptische Enzym der Trockenhefe zu beobachten, braucht man nur einen kalt hergestellten Extrakt der getrockneten Preßhefe sich selbst zu überlassen. Jener Extrakt enthält zuerst die löslichen Albuminstoffe der Hefe, wovon in der Hefe 3,5 % (auf Trockensubstanz berechnet) enthalten sind.

Kocht man frischen Extrakt jener getrockneten Hefe mit Zusatz von einer Spur Essigsäure, so erfolgt eine starke Gerinnung.

Wartet man einige Zeit, etwa 24 Stunden, und sucht an einem solchen gestandenen Extrakt die Gerinnung zu erhalten, so bemerkt man, daß die Gerinnungsfähigkeit verloren gegangen ist.

Es ist aber statt des verschwundenen Albumins auch nicht viel Albumose und Pepton da, wie die betreffenden Reaktionen aufweisen. Also ist ein wirksames tryptisches Ferment in dem Extrakt der getrockneten Hefe vorhanden, durch das die Albuminstoffe weiter als bis zu Pepton umgewandelt werden.

Daß in der getrockneten Preßhefe auch wirksames Pepsin enthalten sei, davon kann man sich durch folgenden Versuch überzeugen:

Um die Trypsinwirkung auszuschließen, setzte ich zu der steinhart getrockneten Preßhefe 0,5 %ige Salzsäure, und zwar auf 8 g getrocknete Hefe 100 ccm dieser Säure.

Dazu wurden dann 25 g fein gewiegtes frisches Rindfleisch gebracht und bei 30° der Verdauung 2 Stunden lang ausgesetzt.

Es stellte sich bald der eigentümliche Verdauungsgeruch ein,

den man auch erhält, wenn man rohes Fleisch mit 0,5 %iger Salzsäure und etwas tierischem Pepsin (aus Schweinemagen) versetzt.

Das Fleisch löste sich sichtlich auf.

Nach 2 Stunden wurde die Flüssigkeit kurz gekocht, dann durch einen Seiher gegossen, um die gröberen, ungelösten Bestandteile zurückzuhalten, dann neutralisiert. Hierbei fielen die noch vorhandenen nicht peptonisierten Eiweißstoffe aus.

Im Filtrat war viel Albumose und Pepton, wie die mit einem kleinen Teil der Lösung angestellten Reaktionen ergaben.

Das übrige Filtrat wurde eingedampft bis zur Trockne, wobei eine rotbräunliche, zerreibliche Masse hinterblieb, die hauptsächlich aus Albumose und Pepton bestand (neben Kochsalz, das auch in dem Trockenrückstand enthalten sein mußte). Die Masse betrug 12 % des angewandten Fleisches, also erstaunlich viel.

Der Extrakt trockner Hefe enthält also auch wirksames Pepsin.

Bezüglich der Zymase zeigte mir schon der erste Versuch mit getrockneter Hefe, daß in der steinhart getrockneten und zerriebenen Hefe noch lebende Zymase vorhanden sei.

Ich bemerkte beim Ansetzen der 3 Tage lang in warmer Luft gelegenen und völlig trocken gewordenen Preßhefe mit Rohrzuckerlösung eine ziemlich kräftige Gärung.

Da aber in dieser kurz getrockneten Hefe möglicherweise doch schon ein Absterben der Zymase sich vorbereiten konnte, so ließ ich eine Portion Preßhefe 8 Tage lang, eine weitere Portion 8 Wochen lang in trockner, sehr warmer Zimmerluft liegen.

Beide wiesen dann beim Ansetzen mit Rohrzuckerlösung Gärungserscheinungen auf, erstere stärker als letztere.

Der Geruch, der von ersterer Gärungsflüssigkeit ausging, war ein angenehmer, kräftiger Gärungsgeruch, die entwickelte Kohlensäure hatte starke Schaumbildung hervorgerufen.

Auch in der Flüssigkeit mit der 8 Wochen lang getrockneten Preßhefe war weingeistiger Geruch wahrzunehmen und auch ziemlich kräftige Schaumbildung. Die mikroskopische Untersuchung lehrte, daß letztere Hefe ganz abgestorben war. Die Zellen hatten granuliertes Aussehen; Sproßverbände und

frische Sprossungen fehlten. Trotz 3tägigem Liegen in der Rohrzuckerlösung hatte sich keine Hefenzelle angeschickt, neue Sprossungen zu treiben; alle Zellen lagen isoliert, d. i. unverbunden miteinander. Die Hefe, die nur 8 Tage lang trocken gelegen war, zeigte nach 2tägigem Aufenthalt in Rohrzuckerlösung manche frische Sprossung, aber doch in der großen Mehrzahl abgestorbene, nicht sprossende Zellen.

Lufttrockene Hefe enthält also nach 8 Tagen, ja nach 8 Wochen noch wirksame Zymase.

Es steckt also nur ein Enzym in der Hefe, das durch völliges Lufttrockenwerden der Hefe abstirbt, nämlich die Maltase.

Das Hefeemulsin wird durch Austrocknen der Hefe nicht vernichtet.

Das Hefemyrosin ebenfalls nicht.

Hingegen soll das Senfmyrosin das Austrocknen schlecht ertragen.

Nach H. Euler[1]) läßt sich freilich auch bei vorsichtiger Entwässerung der Hefe durch Trocknen höchstens $^1/_{15}$ bis $^1/_{30}$ der Zymase wirksam erhalten.

Hingegen bleibt von der Invertase beim Entwässern etwa die Hälfte erhalten. „Zum Vergleich sei erwähnt, daß die gleiche Hefe bei derselben Trocknung nicht mehr als etwa $^1/_{20}$ ihrer Gärwirkung behielt.“

Zur Erklärung der verschiedenen Empfindlichkeit stellt Euler folgende Hypothese auf:

„Die Hefeenzyme sind ursprünglich Bestandteile des Plasmas und werden entweder schon in der lebenden Zelle vom Plasma abgeschieden und dann am Plasma wieder regeneriert; sie sind dann relativ leicht extrahierbar und in relativ großer Menge in den Zellen vorhanden. Oder aber die Abtrennung erfolgt erst (teilweise) beim Entwässern der Hefe oder durch mechanische Mittel, überhaupt unter den Umständen, unter denen das Plasma getötet wird. Gegen Antiseptica sind die Hefenenzyme in dem Maße unempfindlich, als sie vom lebenden Plasma befreit sind.“

Eine andere Erklärung der verschiedenen Empfind-

---

1) Arkiv för Kemi 4 und 13.

lichkeit der Enzyme gegen chemische Einwirkungen ist wohl nicht ganz von der Hand zu weisen.

Es ist bekannt, daß verschiedene Stoffe bei recht verschiedenen Verdünnungsgrenzen mit dem gleichen dritten Stoff reagieren. Das gilt von den echten chemischen Reaktionen, wobei Moleküle zertrümmert und wiederum aufgebaut werden, ganz allgemein; es ist ja zu bekannt, als daß Beispiele nötig wären. Auch reagiert ein und derselbe Stoff verschieden leicht mit verschiedenen Stoffen.

Ganz ebenso verhält es sich nun mit den verschiedenen Enzymen und Plasmen.

Dieselben sind gegen ein und dasselbe Gift sehr verschieden empfindlich.

Ferner verhält sich ein und dasselbe Plasma oder Enzym recht verschieden gegen verschiedene Gifte; die tödlichen Konzentrationen der Gifte müssen immer wieder besonders bestimmt werden.

Bezüglich des Emulsins z. B., das in bitteren Mandeln enthalten ist, wurde von verschiedenen Forschern festgestellt, daß die Empfindlichkeit gegen ein bestimmtes Gift differiert von der anderer Enzyme, wie auch die Empfindlichkeit gegen verschiedene Gifte wiederum immer eine andere ist.

So hat Claude Bernard gefunden, daß das Emulsin der bitteren Mandeln gegen Chloroform, Äther, Thymol unempfindlich ist, ebenso gegen Chloral.

Hingegen wird das Labferment durch Thymol vernichtet.

0,1 % Thymol vernichtet die Zymase binnen 24 Stunden (Chloroformwasser schädigt sie in 24 Stunden nicht).

0,135 % Salzsäure heben die Wirkung des Mandelemulsins binnen 1/2 Stunde völlig auf.

Auf Pepsin wirkt 0,1 bis 0,6 % Salzsäure günstig, ebenso andere Säuren.

0,01 % Sublimat schadet dem Mandelemulsin nicht, während Diastase dadurch binnen 24 Stunden bei 30° getötet wird.

Das Emulsin der Hefe wird, wie oben gezeigt wurde, durch 0,5 %ige Schwefelsäure binnen 24 Stunden dauernd unwirksam gemacht, ebenso durch 0,5 %ige Essigsäure.

0,1 %ige Schwefelsäure reicht hierzu nicht aus.

Auch 0,5%ige Essigsäure vernichtet binnen 24 Stunden die Fermentwirkungskraft des Hefeemulsins.

Hingegen wirkt bei Zymase 2%ige Essigsäure binnen 24 Stunden nur schwächend.

Auch mit dem Myrosin des Senfsamens wie auch der Hefe wurden ähnliche Verschiedenheiten beobachtet.

Das Senfmyrosin wird durch Alkohol stark angegriffen; absoluter und 50%iger Alkohol vernichtet das Ferment binnen 24 Stunden. Hingegen wird z. B. Diastase durch Alkohol nur schwach gehemmt.

Das Myrosin der Hefe verträgt 100%igen Alkohol 12 Stunden lang. Es ist also gegen Alkohol noch unempfindlicher als das Senfmyrosin.

Hefemaltase wird durch Alkohol sehr leicht vernichtet.

Die Zymase wird durch 0,2%igen Alkohol binnen 24 Stunden vernichtet. Das Senfmyrosin erträgt 1%. Vom Pepsin soll der Formaldehyd sogar bis zu 5% ertragen werden.

Gegen Alkalien ist das Pepsin sehr empfindlich.

Dagegen wird die Zymase binnen 24 Stunden durch 0,5% Ätznatron nicht ganz vernichtet.

Pepsin erträgt bis zu 1% Salzsäure.

Andere Enzyme werden durch schwächere Säure schon getötet.

Hefemaltase erträgt das Austrocknen nicht.

Viele andere Enzyme ertragen es so gut, daß sie als trockne Pulver in den Handel kommen.

Auch bei gewöhnlichen Chemikalien ist die Austrocknung manchmal untunlich, indem die Stoffe nur in wäßriger Lösung einigermaßen beständig sind.

Einzelne Fermente können als bis zu einem gewissen Grade giftfest gegenüber anderen Enzymen bezeichnet werden.

Eins der wenigst empfindlichen ist die Invertase.

Invertase: Nach Wróblewski, ferner nach Meisenheimer[1]) ist die Invertase gegen Säure verhältnismäßig wenig empfindlich. Beispielsweise erträgt sie 2 Tage lang Berührung mit 0,7%iger Oxalsäure.

---

[1]) Meisenheimer, Reinigung von Invertasepräparaten durch Behandlung mit Säuren. Diese Zeitschr. 54, 1. und 2. Heft.

Auch nach meinen eigenen Beobachtungen ist die Hefeinvertase gegen Säuren ziemlich wenig empfindlich.

1$^0/_0$ige Oxalsäure schadet hiernach der Hefeinvertase so ziemlich wenig oder fast gar nicht.

0,5$^0/_0$ige Salzsäure schädigt zwar, aber zerstört nicht die Fermentkraft der Hefeinvertase binnen 24 Stunden.

0,5$^0/_0$ige Schwefelsäure verhält sich ebenso.

0,5$^0/_0$ige Natronlauge vermag selbst binnen 4 Tagen die Fermentkraft des Invertins nicht zu zerstören (wohl aber 1$^0/_0$ige).

Dagegen wird z. B. das Labferment durch 0,025$^0/_0$iges Natriumhydroxyd binnen 24 Stunden bei 15 bis 17^0 vernichtet.

Eine kurze Übersicht über diese interessanten Dinge dürfte am Platze sein.

Quantitative Giftwirkung: Deutung derselben.

Es wurde schon früher von dem Verfasser hervorgehoben[1]), daß eine bestimmte Quantität Gift eine bestimmte Menge Protoplasma (Hefe) abzutöten vermag, nicht mehr;

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. **111.**

	Myrosin	Emulsin	Invertase	Diastase
Säuren	1$^0/_0$ige Schwefelsäure vernichtet die Fermentkraft binnen wenigen Stunden bei Senfmyrosin. Hefenemulsin verhält sich ebenso, ja sogar 0,5$^0/_0$ige Schwefelsäure vernichtet dieses, 0,1$^0/_0$ige tötet nicht ganz.	Mandelemulsin wird durch 0,135$^0/_0$ige Salzsäure unwirksam. Hefenemulsin wird durch 0,5$^0/_0$ige Schwefelsäure oder durch 0,5$^0/_0$ige Essigsäure vernichtet, 0,1$^0/_0$ige Schwefelsäure reicht nicht.	Hefeinvertase wird durch 0,5$^0/_0$ige Schwefelsäure geschädigt, aber nicht zerstört (in 24 Std.). Desgl. Salzsäure. 1$^0/_0$ige Oxalsäure schadet binnen 24 Std. nicht merklich. 1$^0/_0$ige Essigsäure schadet nicht. In 0,1$^0/_0$ FH 2 Tage gelegene Hefe hat noch Inversionsvermögen.	0,25$^0/_0$ige Salzsäure wirkt schädlich auf die Verzuckerung durch Speicheldiastase ein.

ferner, daß von einer bestimmten Quantität Protoplasma eine bestimmte Menge des Giftes gebunden wird[2]). Das gilt auch von den Fermenten.

Wegen der Wichtigkeit der Sache seien einige Versuche mitgeteilt.

Je 10 g Preßhefe wurden mit

a) 10 ccm einer 0,5 %igen Schwefelsäure,
b) 25 „ „ „ „
c) 50 „ „ „ „
d) 100 „ „ „ „
e) 5 „ „ „ „
f) 25 „ „ 0,1 %igen „

vermischt und 24 Stunden in einer flachen Schale stehen gelassen.

Nach Ablauf dieser Frist wurden starke Proben herausgenommen und mit Gär- und Nährlösung angerührt. Von diesen Flüssigkeiten wurden dann Platinösenproben entnommen

[2]) B. in Arch. f. d. ges. Physiol. 156.

Pepsin (Magen-)	Trypsin (Pankreas-)	Labferment	Katalase	Maltase	Zymase
Pepsin erträgt bis zu 1 % Salzsäure.	Schon bei einem Säuregehalt von $^{n}/_{1000}$ soll Trypsin nicht mehr wirken.		1 % starke Mineralsäure tötet fast momentan.	1 %ige Salzsäure oder Oxalsäure tötet Hefemaltase ab, 1 % Essigsäure nicht ganz.	0,2 %ige Flußsäure tötet binnen 24 Std. (0,1 %ige nicht). 1 %ige Salzsäure tötet binnen 24 Std. Schwefelsäure tötet bei 1 %, schädigt bei 0,1 bis 0,5 %. 5 %ige Milchsäure vernichtet binnen 24 Std. nicht ganz. Buttersäure 5 % vernichtet in 24 Std., 2 % nicht. 2 %ige Essigsäure schwächt nur binnen 24 Std.

	Myrosin	Emulsin	Invertase	Diastase
Basen	1 %ige Natronlauge tötet das Hefemyrosin, 0,5 %ige ebenfalls.	Alkalien sind für Mandelemulsin schädlich.	Die Fermentkraft der Hefeinvertase wird durch 1 % NaOH binnen 24 Std. vernichtet, nicht aber durch 0,5 % binnen 96 Std. Da 0,5 % die Hefezelle tötet, ersieht man hieran wieder einen Empfindlichkeitsunterschied zwischen Enzym und Protoplasma wie in vielen anderen Fällen auch.	**Schon schwache Alkalien haben einen schädlichen Einfluß auf die Speicheldiastase (z. B. 0,6 %, oder sogar 0,3 % Soda, und auch noch 0,1 %).**
Verschiedene Antiseptica	0,1 %iges Sublimat tötet Senfmyrosin binnen wenigen Stunden; desgl. Silbernitrat. 5 %iger Formaldehyd tötet binnen 24 Std., 1 %iger noch nicht. 2 %ige Salicylsäure vernichtet. Chloral schadet viel weniger. Borax ist unter 6 % wirkungslos. Hefemyrosin wird durch 0,5 %igen Formaldehyd vernichtet.	Auf Mandelemulsin sind Chloroform, Äther, Thymol, Chloral unwirksam (Claude Bernard).	0,1 %iges Sublimat hindert die Inversion des Rohrzuckers durch Hefe nicht ganz, wohl aber 0,5 %iges. 0,1 %iges Silbernitrat hindert ebenfalls, nicht aber 0,02 %iges. Formaldehyd zerstört selbst bei 5 % die Fermentierungskraft nicht binnen 24 Std. 1 %ige Carbolsäure ebenfalls nicht. Thymol und Terpentinöl beeinträchtigen nicht.	**Bleizink- und Eisensalze sollen sehr schädlich auf Diastase einwirken.**

Pepsin (Magen-)	Trypsin (Pankreas-)	Labferment	Katalase	Maltase	Zymase
Das Pepsin (des Magens) ist gegen Alkalien sehr empfindlich; sogar 0,5- bis 1%ige Sodalösung zerstört das Pepsin sehr rasch.	Trypsin wirkt bei schwach alkalischer Reaktion am besten.	1% Ätznatron verhindert die Auslabung der Milch, 0,1% verzögert die Labgerinnung. 0,025% NaOH vernichtet das Labferment binnen 24 Std. bei 15 bis 17°. 0,5% oder 1% Soda verzögert die Auslabung der Milch.	1% Ätznatron tötet fast momentan.	Auf Hefemaltase wirkt 0,5% NaOH binnen 4 Tagen nicht vernichtend, wohl aber 1%; 0,02% fördert.	0,5% Ätznatron schadet binnen 24 Std., vernichtet aber nicht ganz.
Pepsin wird durch geringe Mengen Carbolsäure in seiner Wirkung gestört. Chloroform hemmt nur in größeren Dosen. Formaldehyd wird bis zu 5% ertragen (? B.).	Thymol, Chloroform, Fluornatrium hemmen. Sehr schädlich wirkt Formaldehyd. Schwermetallsalze sind hemmend.	Thymol ist bei Sättigungskonzentration (1:1100) tödlich. Chloroform hindert die Auslabung der Milch nicht. 2,5% Carbolsäure. verhindert. 1% Fluornatrium verhindert. 0,5% Sublimat verhindert. 0,1% Silbernitrat verhindert nicht. 0,5% Formaldehyd verhindert.	0,1% Sublimat ist sehr schädlich. 4 bis 5% Formaldehyd zerstört sehr rasch. Salpetrige Säure ist sehr schädlich. Größere Mengen Wasserstoffsuperoxyd schaden.	Hefemaltase wird durch 1%ige Carbolsäure binnen 24 Std. dauernd unwirksam; 0,1% schadet ihr nicht. Terpentinölwasser schädigt die Hefemaltase binnen 24 Std. stark. 0,1% Thymol vernichtet. Chloroformwasser tötet binnen 24 Std. nicht. 0,01% Silbernitrat tötet; desgl. 0,02% Sublimat. 0,1% Formaldehyd schädigt, 1% tötet.	0,02% Sublimat, ferner 0,01% Höllenstein vernichtet binnen 24 Std.; 0,2% Formaldehyd ebenfalls; 1% Fluornatrium aber nicht (durch 0,005% Gärtätigkeit gefördert). 1%ige Carbolsäure vernichtet binnen 24 Std., 0,1%ige noch nicht. Mit Terpentinöl gesättigtes Wasser macht die Zymase binnen 24 Std. dauernd unwirksam. 0,1% Thymol vernichtet binnen 24 Std. 0,1%iges Chloroformwasser vernichtet binnen 24 Std. nicht, wohl aber 0,5%iges. Geringe Blausäuremengen schaden nicht (Fiechter).

	Myrosin	Emulsin	Invertase	Diastase
Alkohol	Senfmyrosin wird vernichtet durch 50 $^0/_0$igen Alkohol (in 24 Std.). Hefemyrosin verträgt 100 $^0/_0$igen Alkohol 1 Std. lang.	50 $^0/_0$iger Alkohol zerstört bei 24 stündiger Einwirkung das Spaltungsvermögen der Hefe gegen Amygdalin nicht; ja nicht einmal Alkohol bringt das ganz fertig.	20 tägige Einwirkung absoluten Alkohols ist nicht imstande, das Inversionsvermögen der Hefe zu vernichten.	Alkoholfällung (auch mit absol. Alkohol) wurde bei der Darstellung des Fermentes verwendet.
Austrocknen	Senfmyrosin erträgt das Austrocknen schlecht. Trockenhefe hat noch wirksames Myrosin in sich.	Mandelemulsion erträgt das Austrocknen. Hefeemulsion ebenfalls. Mandelemulsion kommt als Trockenpräparat in den Handel.		Die Diastase kann als trocknes Pulver hergestellt werden.
Temperatur	Tötungstemperatur für Senfmyrosin 85°; bei 0° unwirksam (Schmidt).	Wirkungsoptimum für Mandelemulsin 45 bis 50°. Zerstörungstemperatur 70° (trocken erträgt es 100° mehrere Stunden). 80°, ja sogar 50° töten das Hefeemulsin.	Hefeinvertase wirkt nach H. Mayer am besten bei 31°, 70° töten.	Malzdiastase wirkt am besten bei 50 bis 55°, 75° töten.

und in je 50 ccm einer gut sterilisierten Gär- und Nährlösung gebracht, dann die Versuche 24 Stunden im Brütofen bei 26 bis 30° stehen gelassen.

Es zeigte sich nun eine Hefenvermehrung in Versuch e und f.

In Versuch e war die Schwefelsäure in derselben Konzentration (0,5 $^0/_0$) wie in den Versuchen a bis d angewendet worden.

Trotzdem starb die Hefe nicht ab, weil eben diese Quantität der 0,5 $^0/_0$igen Schwefelsäure für 10 g Hefe nicht ausreichte (erst 0,03 bis 0,05 g Schwefelsäure reichen aus).

Wie ein späterer Versuch ergab, tötet auch 0,1 $^0/_0$ die Hefe.

Pepsin (Magen-)	Trypsin (Pankreas-)	Labferment	Katalase	Maltase	Zymase
Alkoholfällung wird bei der Gewinnung des Fermentes verwendet. Doch sollen schon 20 $^0/_0$ Alkohol jede Verdauung verhindern.	Bei der Darstellung wird Fällung und Reinigung mit Alkohol verwendet.		Alkohol, selbst absoluter, ist unschädlich (wie lange, ? B.).	Hefemaltase wird durch Alkohol sehr leicht vernichtet; sogar 5 $^0/_0$iger Alkohol schädigt schon etwas.	50 $^0/_0$iger Äthylalkohol vernichtet die Gärkraft binnen 24 Std.; 20 $^0/_0$igre noch nicht (ähnlich auch Methylalkohol, höhere Alkohole aber sind giftiger).
Pepsin kommt als trocknes Pulver in den Handel. In der Trockenhefe ist wirksames Pepsin enthalten.	In der trocknen Hefe ist wirksames Pepsin enthalten.	Das Labferment kommt als trocknes Pulver in den Handel.	Wirksame Katalase kann als Pulver hergestellt werden.	Hefemaltase erträgt das Austrocknen (mit der Hefe) nicht.	Eingetrockneter Hefepreßsaft verliert die Gärkraft nach 3 Wochen (E. Buchner).
Trocknes Pepsin erträgt 100°, in Lösung wird es durch 55 bis 57° vernichtet.	60° ist Optimaltemperatur, bei 75 bis 80° hört die Fermentwirkung auf.	40° ist die Optimaltemperatur für das Labferment der Milch. Hefelab ist sehr hitzebeständig, wirkt bei 80° (wenn nicht lange) am raschesten.	Tötungstemperatur 72 bis 75° (je nach Reaktion der Lösung, Anwesenheit von Salzen usw.).	Hefemaltase wird durch 25° vernichtet (Lieber und Kröber, Verf.). Maismaltase arbeitet nach Géduld bei 35° am besten.	Bei 25° gelingt die Gärung am besten, bei 53° erlischt sie, bei 0° hört sie nicht auf.

Somit ist Versuch f auch so auszulegen, daß 0,1 $^0/_0$ige Schwefelsäure, wenn sie nur zu 25 ccm auf 10 g Hefe einwirken gelassen wird, quantitativ nicht genügt, um die 10 g Hefe abzutöten.

Schweflige Säure greift bei noch größerer Verdünnung an als Schwefelsäure.

Doch ist die Gesamtmenge schweflige Säure, die zur Tötung nötig ist, etwas größer, nämlich 0,05 g bis 0,1 g.

Flußsäure verhält sich bezüglich der letalen Dosis wiederum ähnlich wie Schwefelsäure.

Es sind nur 0,025 g zur Tötung von 10 g Preßhefe nötig. Dabei wirkt hier schon eine Verdünnung von 0,01 $^0/_0$ tödlich.

Z. B. können 10 g Preßhefe durch 25 ccm einer 0,01 %igen Flußsäure völlig abgetötet werden.

Von Formaldehyd ist 0,025 g noch nicht ganz ausreichend, um die Abtötung von 10 g Preßhefe zu bewirken. 0,05 g reicht schon völlig aus.

Bemerkenswert ist, daß die Gärkraft weniger leicht schwindet als das Vermehrungsvermögen der Hefe.

So kann man bei Anwendung von 50 ccm einer 0,1 %igen Formaldehydlösung (= 0,05 g Formaldehyd) auf 10 g Preßhefe bemerken, daß nach 24 Stunden noch Gärkraft vorhanden ist, aber keine Vermehrungskraft mehr (Hefe tot).

Bei Anwendung von nur 25 ccm einer 0,1 %igen Formaldehydlösung bleibt außer dem Gärvermögen auch noch etwas Vermehrungsfähigkeit übrig.

Das kann nun an der geringeren Empfindlichkeit der Zymase gegen Formaldehyd liegen; es liegt auch wirklich hierin der Grund.

Hingegen wird durch 0,25 % auch die Zymase zerstört, wenn genügende Mengen Lösung gebraucht werden.

In 500 ccm einer 0,25 %igen Formaldehydlösung stirbt nicht bloß das Hefeprotoplasma von 10 g Preßhefe, sondern auch die Zymase derselben ab. Es wird dann weder Rohrzucker noch Malzzucker noch Traubenzucker vergoren.

In Analogie mit gewissen anderen Versuchen muß wohl angenommen werden, daß es bei 0,25 % Formaldehyd eine Quantität Lösung gibt, welche die 10 g Preßhefe, aber nicht die Zymase derselben abtötet; denn die Zymase ist weniger empfindlich gegen Formaldehyd, somit weniger reaktionsfähig, sie wird also erst nach dem Hefeprotoplasma reagieren.

Eigene auf diesen Punkt gerichtete Versuche[1]) haben das faktisch ergeben.

Man kann die Menge einer 0,5 %igen Schwefelsäure so wählen, daß dadurch das Hefeprotoplasma getötet wird, die Zymase aber zum großen Teile noch wirksam bleibt, wiewohl 0,5 % eine tödliche Konzentration nicht bloß für das Protoplasma, sondern auch für die Zymase ist.

---

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. **114**.

Versuch 1.

2 g frische Preßhefe wurden mit 2 ccm einer 0,5 $^0/_0$igen Schwefelsäure 24 Stunden lang stehen gelassen.

Die Hefe wurde dann gewaschen und zu einem Gärungsversuch mit 50 ccm einer 10 $^0/_0$igen Rohrzuckerlösung verwendet.

Nach 6 stündigem Aufenthalt im Brutofen war kräftige Gärung eingetreten.

Das Gärungsferment war also noch nicht abgetötet, während 2 ccm einer 0,5 $^0/_0$igen Schwefelsäure, d. i. 0,01 g H_2SO_4, gerade ausreichen, um das Protoplasma von 2 g Hefe abzutöten (siehe oben).

Versuch 2.

2 g frische Preßhefe wurden mit 3 ccm einer 0,5 $^0/_0$igen Schwefelsäure versetzt, sonst alles wie bei Versuch 1.

Nach 6 stündigem Aufenthalt im Brutofen waren nur 2 ccm Gas gebildet.

Also war hier auch das Gärferment durch die Säure abgetötet.

Der Überschuß von 0,005 g H_2SO_4 (gegen Versuch 1) hatte ausgereicht, um auch die vorhandene Zymase (durch chemische Bindung) nahezu völlig unwirksam zu machen.

Versuch 3.

2 g frische Preßhefe mit 5 ccm einer 0,5 $^0/_0$igen Schwefelsäure, sonst wie bei Versuch 1. Nach 6 stündigem Aufenthalt im Brutofen zeigte sich keine Spur von Gärung; es war kein Gas gebildet worden. Die Zymase war also durch den vorhandenen Überschuß an H_2SO_4 (0,015 g) völlig unwirksam geworden.

Versuch 4.

2 g frische Preßhefe mit 10 ccm einer 0,5 $^0/_0$igen Schwefelsäure, sonst wie bei Versuch 1. Nach 6 stündigem Aufenthalt im Brutofen war keine Spur von Gärung zu bemerken. Der Überschuß von Schwefelsäure (0,04 g) hatte hier natürlich noch leichter ausgereicht zur Abtötung der „Zymase“ als bei Versuch 2 und 3.

Man kann also faktisch die Menge der 0,5 % igen Schwefelsäure so bemessen, daß dadurch das Hefeprotoplasma abgetötet wird, während die Zymase noch zum großen Teile wirksam bleibt. 2 ccm einer 0,5 % igen Schwefelsäure haben auf 2 g (Münchner) Brauereipreßhefe diese Wirkung. 3 ccm töten auch die Zymase ab.

Zu erklären ist dies nur aus der quantitativen Wirkung der Gifte unter der Annahme, daß das Protoplasmaeiweiß in rascherem Tempo reagiert als die Zymase. Ersteres nimmt das Gift rascher an sich als das letztere, so daß ein Punkt erreichbar ist, bei dem jede Zelle der angewendeten Hefe abgetötet wird, während die Zymase noch am Leben bleibt.

Ganz ähnliche Versuche wurden vom Verfasser auch mit Formaldehyd angestellt.

Es zeigte sich, daß 0,025 g Formaldehyd, welche 2 g Preßhefe völlig abtöten, nur eine Spur von Gärkraft übrig lassen, während 0,015 g die Hefe völlig abtöten, aber die Gärkraft noch zum beträchtlichen Teile bestehen lassen.

Bei Sublimat, mit welchem Gift die gleichen Versuche gemacht wurden, genügen 0,005 g, um die gänzliche Abtötung von 10 g Preßhefe zu bewirken, die Gärkraft bleibt aber erhalten.

Verfasser hat diese Versuche zunächst in der Absicht angestellt, eine Trennung von Leben und Gärkraft herbeizuführen.

Weitere Versuche zu demselben Zwecke wurden dann in der Weise gemacht, daß Verdünnungen der Gifte ausfindig gemacht wurden, die das Plasma töten, nicht die Enzyme[1]). Alle beide, namentlich die ersteren, können zur Deutung der Giftwirkung dienen.

Ähnliche Versuche lassen sich unschwer auch mit dem Emulsin und Myrosin anstellen.

Versuch a.

Amygdalin	1 g
Preßhefe	2 g
0,5 % ige Schwefelsäure . .	2 ccm

[1]) B. in Arch. f. d. ges. Physiol. 152.

Nach 24 Stunden bei 20° war deutlicher Bittermandelölgeruch und Gärung wahrzunehmen, ähnlich wie bei einem gleichzeitig aufgestellten Nebenversuch ohne Schwefelsäure. Sogar ein im kalten Zimmer bei 10° aufgestellter Kontrollversuch ergab binnen 24 Stunden Mandelölgeruch.

Versuch b.

Amygdalin	1 g
Preßhefe	2 g
0,5 %ige Schwefelsäure . .	4 ccm

Nach 24 Stunden war weder Gärung noch Bittermandelölgeruch wahrzunehmen.

Ebensowenig nach 48 Stunden und nach 3 oder 4 Tagen und noch später.

Angesichts dieser Tatsachen ist es schwer, sich von der Wirkung der Gifte eine andere Vorstellung zu machen, als von dem Verf. schon wiederholt angegeben wurde, nämlich die einer chemischen Bindung.

0,5 %ige Schwefelsäure ist bei genügender Menge tödlich für Protoplasma und Enzym.

Wird nur etwas weniger Schwefelsäure von derselben Stärke dargeboten, so ist das Protoplasma getötet, das Enzym nicht.

Nimmt man noch weniger Schwefelsäure von 0,5 %, so wird nicht einmal die Hefe ganz abgetötet; man findet noch vermehrungsfähige Zellen.

Kann das sein, wenn das Gift durch Kontakt und nicht durch chemische Bindung wirkt?

Faktisch konnte von dem Verf. eine chemische Bindung nachgewiesen werden[1]; das Gift wird aus der Lösung weggenommen, wenn man lebende Hefe in die Giftlösung einträgt (Ameisensäure bildet eine merkwürdige Ausnahme); freilich meist weit mehr als zur Abtötung des Protoplasmas nötig ist.

Auf 20 g Preßhefe von 30 % Trockensubstanz beträgt die Wegnahme:

---

[1]) B. in Arch. f. d. ges. Physiol. 156.

bei		aus konzentrierteren Lösungen (1—5 %) g	aus verdünnteren Lösungen (ca. 0,5—0,05 %) g	aus sehr verdünnten Lösungen (ca. 0,04—0,01 %) g
Ammoniak . .	ca.	1,0	—	0,075 [1]
Natron . . .	ca.	1,36	0,00	0,00
Hydrazinhydrat . .		0,50	0,1	—
Schwefelsäure . . .		0,6	0,49	0,00
Flußsäure		0,32	0,10	—
Ameisensäure . . .		0,00	0,00	0,00
Essigsäure		0,90	0,00	0,00
Oxalsäure		0,945	0,00	0,00
Schweflige Säure .		—	0,072	0,072

Es fällt auf, daß so große Mengen Gift gebunden werden.

Von Ammoniak 1 g pro 20 g Preßhefe, Natron 1,36 g.

Das macht 5 % bzw. 6,80 % vom Gewicht der Preßhefe oder 15 % bzw. 20,40 % vom Gewicht der Hefetrockensubstanz.

Bei Schwefelsäure macht es 3 % vom Gewicht der Preßhefe.

Es ist wohl kaum möglich, die Bindung auf einen andern Stoff als das Protein der Hefe zurückzuführen, das bekanntlich sehr reichlich vorhanden ist. Die Hefezellen gehören zu den eiweißreichsten.

Die geringen Mengen von flüchtigen und nichtflüchtigen niederen organischen Säuren (Kohlensäure, Milchsäure, Bernsteinsäure), die in der Hefe vorkommen können, spielen offenbar bei der Basenbindung durch Hefe (es wird z. B. Ammoniak in erheblicher Menge gebunden)[2] eine geringe Rolle.

Ebenso dürften etwa vorhandene einfachere organische Basen für die Säurebindung durch Hefe eine geringe Bedeutung haben.

Das Hefeprotein, welches das Plasma der Hefe aufbaut, ist offenbar ein Körper von zweifacher, ja mehrfacher Natur.

Er vermag Säuren zu binden wegen seiner basischen Gruppen.

Basen werden von den sauren Atomgruppen desselben gebunden.

---

[1]) Wenn lebend; tote Hefe bindet 0,00 g NH_3.

[2]) B. in Arch. f. d. ges. Physiol. **156**.

Die Aldehydgruppen der Proteinstoffe binden bestimmte Gifte.

Daß aus verdünnteren Lösungen meist weniger Gift gebunden wird, ist zwanglos aus dem Absitzen der Hefe zu erklären.

Warum in stärker verdünnter Lösung oft gar keine Bindung stattfindet, versteht sich leicht aus der bekannten Erscheinung, daß chemische Reaktionen von einer gewissen Verdünnung an nicht mehr eintreten. Es ist die Reaktionsgrenze dann erreicht.

Die Empfindlichkeit ist bei verschiedenen Stoffen sehr verschieden.

So ist es auch zu begreifen, warum bei schwefliger Säure eine Bindung stattfindet, wenn die Verdünnung 0,075 % beträgt (vielleicht bei noch größerer Verdünnung). Ebenso bei Ammoniak.

Die Unterschiede zwischen Giften derselben Art, wie Schwefelsäure und Flußsäure und Essigsäure (bei gleicher 1 bis 5 % betragender Konzentration) erklären sich aus dem verschiedenen Äquivalentgewicht.

Von der Gesamtmenge Gift, die durch das Protoplasma gebunden werden kann, ist wohl zu unterscheiden die letale Dosis, von der schon früher die Rede war (bei Schwefelsäure beträgt Gesamtmenge 0,3 g, letale Menge 0,025 bis 0,05 g pro 10 g Preßhefe).

Letztere ist viel geringer als die erstere.

Dafür gibt es zwei Gründe.

Fürs erste genügt natürlich schon eine geringe Bindung fremdartiger chemischer Stoffe im Protoplasma, um das Weiterleben unmöglich zu machen. Die schädliche Wirkung pflanzt sich bei der Eigenart des Protoplasmas, dem wir wohl eine sehr großmolekulare Beschaffenheit zusprechen müssen, von einer Stelle, wo die chemische Schädigung eingetreten ist, auf andere nicht direkt beschädigte Stellen fort. Das entspricht ja auch der direkten mikroskopischen Beobachtung. Wenn eine Spirogyrenzelle an einem Ende auf irgendeine Weise (chemisch oder mechanisch) geschädigt wurde, so bemerkt man bald ein Absterben der ganzen Zelle.

Fürs zweite reagieren in vielen Fällen auch tote Plasma-

proteinteile, weil eben das tote Plasmaprotein zum Teil dieselben Atomgruppen, z. B. Amidogruppen, enthält wie das lebende, somit die Reaktion nach dem Tode der Zelle noch weiter fortschreitet.

Die letalen Mengen von Gift für 10 g Hefe sind übrigens vom Verf.[1]) sehr verschieden gefunden worden für verschiedene Arten von Gift.

Sie beträgt pro 10 g Preßhefe bei

Schwefelsäure (H_2SO_4)	0,025 bis 0,05 g
Schweflige Säure (SO_2)	0,05 „ 0,1 g
Flußsäure	0,01 „ 0,025 g
Fluornatrium	0,05 „ 0,1 g
Salzsäure	0,05 „ 0,1 g
Chlor	0,015 „ 0,03 g
Natron (NaOH)	0,05 „ 0,1 g
Salzsaures Hydroxylamin [$NH_2(OH).HCl$)	1 g reicht nicht aus (Salz nicht gespalten)
Kaliumchlorat	1 g genügt nicht (nicht giftig für Hefe?)
Kaliumpermanganat	0,02 bis 0,05 g
Wasserstoffsuperoxyd	Tötung der Hefe gelingt nicht, weil sich H_2O_2 sofort an der Oberfläche der Hefezellen unter Schäumen zersetzt.
Eisenvitriol ($FeSO_4 . 7\,aq$)	0,05 g genügt
Kobaltnitrat [$Co(NO_3)_2 . 6\,aq$]	0.25 bis 0,30 g genügt
Nickelsulfat ($NiSO_4$)	0,2 g reicht nicht
Zinkvitriol ($ZnSO_4 . 7\,aq$)	0,05 bis 0,1 g reicht
Manganvitriol	0,4 g reicht nicht (Manganvitriol überhaupt nicht giftig für Hefe).
Bleizucker	0,05 bis 0,1 g reicht
Kupfervitriol ($CuSO_4 \cdot 5\,aq$)	0,001 „ 0,0025 g reicht
Sublimat	0,005 „ 0,01 g reicht aus
Silbernitrat	0,01 „ 0,02 g reicht

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. **111**.

Formaldehyd	0,025 „ 0,05 g reicht
Blausäure	0,4 g reicht für 10 g Conferia, 0,2 g noch nicht
Buttersäure	0,05 bis 0,1 g
Strychninnitrat	0,1 g reicht für 10 g Algen, 0,025 g nicht (für 10 g Hefe reicht 1 g nicht?)
Hydrochinon	1 g reicht nicht
Brenzkatechin	0,5 bis 1 g
Tannin	0,5 „ 1 g
Pyrogallol	wenig. als 0,5 g reicht f. 10 g Hefe
Methylviolett	0,2 bis 0,25 g
Milchsäure	0,5 g reicht nicht.

Die geringste letale Dosis ist bei Kupfervitriol mit 0,001 bis 0,0025 g verzeichnet, die größte bei Gerbsäure und Hydrochinon mit 0,5 bis 1 g; 0,001 verhält sich zu 0,5 wie 1 : 500; es herrscht also ein 500facher Unterschied.

Die Angabe bei Milchsäure, wonach 0,5 g für 10 g Hefe nicht letal sind, ist so zu verstehen, daß die Hefe von Milchsäure in der vom Verf. angewandten Konzentration 0,5 % nicht giftig für Hefe ist. 0,5 % Milchsäure beeinträchtigt nach Märcker die Hefevermehrung günstig; 1 % schadet nicht; 3,5 % sistiert die Vermehrung der Hefe.

Wie kommt es, daß Kupfervitriol, Sublimat ... schon bei so geringen Dosen letal sind?

Sie rufen offenbar schon beim ersten Angriff auf die Zelle eine so empfindliche schwerwiegende Störung hervor, daß beim geringsten Eindringen an einer relativ engen Stelle des Protoplasmas Abtötung des ganzen Zelleibes erfolgt.

Wieviel von dem Kupfervitriol, Sublimat und anderen scharfen Giften faktisch im ganzen (die Bindung nach dem Absterben des Protoplasmas mitgerechnet) gebunden wird, wurde bis jetzt in einigen Fällen festgestellt,

So binden 10 g Preßhefe aus 50 ccm einer 1 %igen Kupfervitriollösung binnen 14 Tagen 0,125 g Kupfervitriol.

Die schließlich gebundene Kupfervitriolmenge übertrifft also die letale Dosis um das 100fache.

Der Verlauf der Bindung und des hierdurch erfolgenden Absterbens des Protoplasmas kann besonders mit Farbstoffen,

wie Viktoriablau, Methylviolett, gut an Infusorien verfolgt werden.

Bei Anwendung sehr hoch verdünnter Lösungen bemerkt man, wie anfangs die Bewegung der bereits etwas gefärbten Infusorien noch fortdauert; erst mit der stärkeren Färbung tritt der Tod und damit die Bewegungslosigkeit ein, die Färbung macht aber dann noch weitere Fortschritte, bis die Grenze der Bindung erreicht ist.

Wie fest die chemische Bindung ist, wurde durch eine Anzahl von Versuchen festgestellt[1]).

So verändert Kupfervitriolhefe (Hefe, die Kupfervitriol gebunden hat) ihre Farbe mit 2 %igem Ammoniak gar nicht. Mit konzentriertem 30 %igem Ammoniak wird sie schwach blaugrünlich.

Mit kohlensaurem Ammoniak verhält es sich ähnlich.

Ätzkali fällt aus Kupfervitriollösung in der Kälte grünlichblaues Kupferhydroxyd, in der Siedehitze schwarzes Kupferoxyd.

Versetzt man Kupfervitriolhefe mit sehr verdünnter Kalilauge, etwa 1 %iger, so nimmt sie eine blaßrosarote Farbe an.

Offenbar handelt es sich hier um eine Biuretreaktion, die die Proteinstoffe der Hefe geben.

Ähnlich verhält sich die Kupfervitriolhefe gegen Natronlauge.

Es ist also ein ganz anderes Verhalten als das des ungebundenen Kupfervitriols zu konstatieren.

Durch Erwärmen bis zum Siedepunkt erhöht sich noch die Rotviolettfärbung.

Rhodankalium fällt aus konzentrierten Kupfervitriollösungen schwarzes, leicht zersetzliches Kupferrhodanid $(CNS)_2Cu$.

Die Kupfervitriolhefe wird durch Rhodankaliumlösungen nicht im geringsten dunkel gefärbt.

Aus dieser Reaktion geht wohl zweifellos hervor, daß das Kupfervitriol chemisch gebunden wurde (mit Schwefelwasserstoff nimmt die Kupfervitriolhefe eine schwache Rosafärbung an, keine Schwarzfärbung).

Ammoniakhefe gibt mit rotem Lackmuspapier nur Spuren von alkalischer Reaktion, obwohl sie mehrere Prozente Ammoniak enthält.

---

[1]) B. in Arch. f. d. ges. Physiol. **156**.

Sie riecht auch nicht nach Ammoniak.

Beim Kochen mit Kalkhydrat wird Ammoniak abgespalten.

Mit salpetersaurem Quecksilberoxydul nimmt die Ammoniakhefe keine dunkle Färbung an.

Bringt man gut ausgewaschene Eisenvitriolhefe in Schwefelkaliumlösung, so nimmt dieselbe keine Schwarzfärbung an.

Mit Kali- oder Natronlauge erleidet sie keine sichtbare Veränderung, selbst nicht bei Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd.

Mit Ferrocyankalium reagiert sie in keiner sichtbaren Weise, ebensowenig mit Ferricyankalium.

Bleizuckerhefe wird allerdings durch Schwefelammonium schwarz gefärbt. Also tritt hier eine Abspaltung des gebundenen Bleies ein.

Ebenso färbt sich Sublimathefe mit Schwefelammonium intensiv schwarz.

Dagegen erleidet sie mit Kalilauge oder mit Jodkalium keine sichtbare Veränderung.

Auch bei Enzymen läßt sich eine chemische Bindung des Giftes nachweisen.

Das Emulsin aus Mandeln vermag Basen und Säuren zu binden[1]).

Bei Anwendung von n-Ammoniak war eine Bindung von 4,25 % NH_3 durch das Emulsin nachzuweisen.

Bei n-Schwefelsäure eine Bindung von 7,35 % H_4SO_4.

Mein Mandelemulsin war eine trockene Masse, bestand aus durchschimmernden grauvioletten Stückchen, war in Wasser schwer löslich, in n-Ammoniak etwas mit bräunlicher Farbe löslich, der Rückstand schleimig, in n-Schwefelsäure unlöslich (Reaktion gegen Lackmus etwas sauer).

Ein (von Grübler, Dresden, stammendes) Labpulver von sehr guter Wirkung auf Milch wurde von mir ebenfalls auf Bindungskraft gegen Säuren und Basen geprüft.

Es stellte sich heraus, daß davon 3,4 % Ammoniak und 2,94 % Schwefelsäure gebunden werden, beide aus Normallösung.

Die Reaktion meines Labpulvers gegen Lackmus war sauer. 1 g Lab löste sich in 10 ccm Wasser teilweise, 10 ccm n-Ammoniak ganz auf.

---

[1]) B. in dieser Zeitschr. 70, Heft 3 und 4.

Mit frisch bezogenem Trypsin, einem graugelblichen Pulver, das aus der Bauchspeicheldrüse hergestellt war, ergab ein Versuch 3,4 % Ammoniakbindung und 1,96 % Schwefelsäurebindung.

Die Reaktion des Pulvers war neutral, 1 g Trypsinpulver war in 10 ccm Wasser nur wenig löslich, dito in 10 ccm n-Schwefelsäure, aber ganz leicht löslich in 10 ccm n-Ammoniak.

Ein altes Trypsinpulver vermochte sogar 3,79 % Ammoniak und 5,88 % Schwefelsäure zu binden. Seine Reaktion gegen Lackmus war neutral; im Wasser war es ziemlich schwer löslich, ebenso in n-Schwefelsäure, leichter in n-Ammoniak.

Ein Präparat Taka-Diastase, das eine ganz schwach alkalische Reaktion gegen Lackmuspapier zeigte, vermochte 3,74 % seines Gewichtes Ammoniak zu binden.

Malzdiastase, ein gelblichgraues, kaum merklich alkalisch reagierendes, in Wasser fast unlösliches Pulver, das auch in n-Ammoniak und n-Natron nur wenig löslich war, vermochte 10 % Ammoniak zu binden.

Hingegen konnte eine Bindung der n-Schwefelsäure nicht festgestellt werden.

Pepsin war unter allen bis jetzt geprüften Fermenten das einzige, das weder Säure aus n-Schwefelsäure, noch Ammoniak aus n-Ammoniak zu binden vermochte.

Über den biochemischen Abbau sekundärer und tertiärer Amine durch Hefen und Schimmelpilze.

Von

Felix Ehrlich.

(Aus dem Landwirtschaftlich-technologischen Institut der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 21. April 1916.)

Die durch frühere Arbeiten[1]) gewonnene Erkenntnis, daß bei der Assimilation Hefe die α-Aminosäuren normal zu den um ein C-Atom ärmeren Alkoholen abbaut, während gewisse Schimmelpilze, wie Oidium lactis und andere, daraus Oxysäuren von gleicher Kohlenstoffanzahl bereiten, entsprechend den beiden Gleichungen

$$R.CH(NH_2).CO_2H + H_2O = R.CH_2OH + CO_2 + NH_3$$

und

$$R.CH(NH_2).CO_2H + H_2O = R.CH(OH).CO_2H + NH_3,$$

ließ weitere Untersuchungen darüber erwünscht erscheinen, ob ähnlich konstituierte organische Stickstoffverbindungen einer analogen Wirkung dieser Mikroorganismen unterliegen.

Zunächst zeigten Versuche[2]) an primären Aminen der Fettreihe und der fettaromatischen Reihe, daß diese für den menschlichen und tierischen Organismus mehr oder minder

---

[1]) F. Ehrlich, diese Zeitschr. **1**, 8, 1906; **2**, 52, 1906; **8**, 438, 1908; **18**, 391, 1909; **36**, 477, 1911; **63**, 379, 1914; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **39**, 4072, 1906; **40**, 1027, 2538, 1907; **44**, 139, 888, 1911; **45**, 883, 1912.

[2]) F. Ehrlich und P. Pistschimuka, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**, 1006, 1912.

giftigen Substanzen für manche Hefen- und Schimmelpilzrassen ausgezeichnete Stickstoffnährstoffe bilden, die bei der Assimilation ebenfalls desamidiert und fast quantitativ in Alkohole übergeführt werden:

$$R.CH_2.NH_2 + H_2O = R.CH_2OH + NH_3.$$

So wurde aus Isoamylamin Isoamylalkohol

$$(CH_3)_2CH_2.CH_2.CH_2NH_2 \rightarrow (CH)_3CH_2.CH_2.CH_2OH$$

und aus p-Oxyphenyläthylamin p-Oxyphenyläthylalkohol (Tyrosol)

$$HO\langle\quad\rangle CH_2.CH_2NH_2 \rightarrow HO\langle\quad\rangle CH_2.CH_2OH$$

mittels der Hefe Willia anomala Hansen und des Schimmelpilzes Oidium lactis erhalten. Es hat hier also in gewissem Sinne eine Entgiftung der Basen durch das Wachstum der Mikroorganismen stattgefunden, die besonderes physiologisches Interesse bietet, da neuerdings M. Guggenheim und W. Löffler[1]) die gleichen Übergänge von Aminen in Alkohole im Tierkörper festgestellt haben.

Andrerseits ließ sich auch der Nachweis erbringen, daß trimethylierte Aminosäuren vom Typus des Betains[2]) durch bestimmte Heferassen ähnlich wie einfache Aminosäuren durch Schimmelpilze[3]) zu Oxysäuren abgebaut werden, z. B. Betain selbst zu Glykolsäure

$$(CH_3)_3N.CH_2.COO + H_2O = CH_2(OH).CO_2H + N(CH_3)_3,$$

wobei das intermediär abgespaltene Trimethylamin ebenso wie das Ammoniakmolekül in den obigen biochemischen Gleichungen dem weiteren Ab- und Aufbau des Assimilationsprozesses anheimfällt.

Angesichts der hier schon zu beobachtenden Mannigfaltigkeit der verschieden konstituierten organischen Stickstoffverbindungen, die dem Angriff von Mikroorganismen erliegen,

---

[1]) Diese Zeitschr. 72, 325, 1915.

[2]) F. Ehrlich und F. Lange, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 46, 2746, 1913; Zeitschr. Ver. Deutsch. Zuckerind. 64, 158, 1914.

[3]) F. Ehrlich und K. Jacobsen, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 44, 888, 1911.

schien es nun in mehrfacher Hinsicht von Interesse zu versuchen, ob auch sekundäre und tertiäre Amine ähnlicher biochemischer Umwandlungen fähig sind und ob sich in diesem Falle analoge Stoffwechselprodukte isolieren lassen. Zu dieser Vermutung mußte schon der eigenartige biochemische Abbau des Betains führen, das seiner Konstitution nach als carboxyliertes tertiäres Amin aufzufassen ist, aber ganz ähnlich wie die primären Amine von Kahmhefen gespalten wird.

Über das biochemische Verhalten von Mikroorganismen gegen sekundäre und tertiäre Amine liegen bisher nur wenige Angaben[1]) in botanischen Arbeiten vor, die sich allein auf das Wachstum gewisser Schimmelpilze beziehen. So haben Lutz und später Czapek Vegetation von Aspergillus niger und Penicillium glaucum auf den Lösungen von Mono-, Di- und Trialkylaminen feststellen können, kommen aber hinsichtlich des Nährwerts dieser Stickstoffverbindungen zu einander widersprechenden Resultaten. Auch finden sich in keinem Falle in der Literatur Mitteilungen darüber, ob Amine derartiger Konstitution vollständig oder unter Spaltung zur Assimilation gelangt sind.

In den folgenden Versuchen wurden sterile Lösungen von sekundären und tertiären Aminen, die mit Zucker oder Alkohol als Kohlenstoffquelle und mit entsprechenden anorganischen Nährsalzen bei Abwesenheit jeder sonstigen Stickstoffnahrung versetzt waren, mit Reinkulturen der Heferasse Willia anomala Hansen und der Schimmelpilze Oidium lactis und Penicillium glaucum beimpft und nach längerem Wachstum der Organismen auf dabei entstandene Abbauprodukte untersucht.

Für die Zwecke der Versuche erschienen als sekundäres Amin das Adrenalin, als tertiäres das Hordenin besonders geeignet, zwei Basen, die wegen ihrer interessanten chemischen und physiologischen Eigenschaften ja gerade in den letzten Jahren vielseitige Durchforschung erfahren haben.

[1]) Lafar, Handbuch der techn. Mykologie, 2. Aufl. 1, 406 bis 408.

In allen folgenden Versuchen ließ sich ein deutliches Wachstum der betreffenden Organismen auf Adrenalinlösungen wahrnehmen, allerdings verlief die Vegetation meist nur schwach und langsam, auch zeigten die Hefen und Pilze oft schon nach einigen Tagen eine eigentümliche Hemmung in ihrer Entwicklung. Immerhin war nach einigen Wochen in mehreren Kulturen soviel Pilz gewachsen, daß eine Bestimmung der geernteten Trockensubstanz ausgeführt werden konnte, die z. B. bei Penicillium glaucum in einer 0,04 $^0/_0$igen Adrenalinlösung nach Verlauf von 11 Monaten im ganzen 1,18 g mit 0,0126 g Stickstoff betrug. Auch war bei den mit Willia anomala beimpften Flüssigkeiten ein deutlicher Geruch nach Essigester wahrnehmbar, der für das Wachstum dieser Hefe besonders charakteristisch ist. Bei einer offen aufbewahrten Adrenalinlösung, die infolge der Infektion durch Luftkeime von Bakterien und einer Reihe von Schimmelpilzen befallen war, wurden 0,84 g Pilztrockensubstanz mit 0,0133 g Stickstoff geerntet. Es scheint also soviel sicher, daß auch ein sekundäres Amin wie das Adrenalin unter Umständen als Stickstoffnahrung für manche Mikroorganismen dienen kann, was in Anbetracht der großen Giftigkeit dieser Base nicht ohne Interesse sein dürfte.

Eine Isolierung und Reindarstellung von Stoffwechselprodukten aus den beimpften Adrenalinlösungen war vorläufig leider nicht durchzuführen, da nur geringe Mengen dieser kostbaren Substanz zur Verfügung standen. Immerhin war in einem Versuche deutlich der Nachweis zu erbringen, daß sich beim Wachstum von Willia anomala auf Adrenalin eine im Gegensatz zum Adrenalin in Äther lösliche Substanz isolieren läßt, die Fehlingsche Lösung und ammoniakalische Silberlösung reduzierte, die letztere bereits in der Kälte, und die mit verdünnter Eisenchloridlösung eine beständige olivgrüne Färbung gab. Aus diesem Verhalten des bisher nur durch seine Reaktionen zu kennzeichnenden Stoffwechselproduktes und aus den unten mitgeteilten Befunden am Hordenin läßt sich mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit der Schluß ziehen, daß ähnlich wie die primären Amine zu Alkoholen das von der Kahmhefe assimilierte Adrenalin partiell zu dem entsprechenden Alkohol, dem m-p-Dioxyphenyläthylenglykol, abgebaut

wird, der seiner Konstitution zufolge gleichgerichtete Reaktionen geben müßte, entsprechend dem Schema:

$$\text{(HO)}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{.CH(OH).CH}_2\text{.NH(CH}_3\text{)} \longrightarrow \text{(HO)}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{.CHOH.CH}_2\text{OH}$$

Adrenalin m-p-Dioxyphenyläthylenglykol

Noch deutlicher als am Adrenalin ließ sich die eigentümliche biochemische Umwandlung von am Stickstoff methylierten Aminen durch Hefe- und Schimmelpilze an einer tertiären Base, dem Hordenin, verfolgen. Diese stark basische Substanz von geringerer blutdrucksteigernder Wirkung wie das Adrenalin ist zuerst aus Malzkeimen isoliert worden[1]). Ihre chemische Konstitution als p-Oxyphenyläthyldimethylamin

$$\text{HO}\,\text{C}_6\text{H}_4\,\text{CH}_2\text{.CH}_2\text{.N(CH}_3\text{)}_2$$

wurde durch eine ganze Reihe von Synthesen[2]) sichergestellt. Über das Verhalten der tertiären Base gegen Mikroorganismen ist bisher nur soviel bekannt, daß sie auf schädliche Bakterien des Darmes nach Roux abtötend wirkt, weshalb man wohl früher Abkochungen hordeninhaltiger Malzkeime therapeutisch verwendet hat.

Die folgenden Versuche zeigen zunächst, daß das Hordenin auf gewisse Heferassen, wie die Kahmhefen, und ebenso auf Schimmelpilze keineswegs giftig wirkt. Vielmehr ließ sich beobachten, daß diese Mikroorganismen auf den Lösungen der Base zum Teil sehr üppig gedeihen und den Stickstoff des Hordenins für den Eiweißaufbau sehr günstig verwerten können, wie aus den nicht unbeträchtlichen Mengen der geernteten Pilztrockensubstanz ersichtlich ist. Dabei ist zu bemerken, daß das

[1]) Léger, Compt. rend. **142**, 108, 1906. — Gaebel, Arch. Pharm. **244**, 435, 1906.

[2]) G. Barger, Journ. Chem. Soc. **95**, 2193, 1909. — K. W. Rosenmund, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **43**, 306, 1910. — Fr. Bayer & Co. D.R.P. Kl. 12 Nr. 23069, 1910. — H. Voswinckel, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**, 1004, 1912. — F. Ehrlich und P. Pistschimuka, ebenda **45**, 2428, 1912.

Wachstum ebenso gut erfolgt, wenn den Pilzen statt Zucker Alkohol als Kohlenstoffquelle dient.

Bei der Nachforschung über den Verlauf der biochemischen Umwandlung des Hordenins durch Hefen und Schimmelpilze ließ sich nachweisen, daß durch die Vegetation von Willia anomala und Oidium lactis wesentliche Mengen von Hordenin aus den Lösungen verschwanden und daß an Stelle der Base in äquivalenter Menge sich in den vergorenen Lösungen der Alkohol Tyrosol (p-Oxyphenyläthylalkohol) vorfand, der sich daraus nach bekannten Methoden leicht isolieren ließ. Es war also aus dem Hordenin durch Pilzgärung dieselbe Substanz entstanden, wie sie durch Vergärung von Tyrosin[1]) und p-Oxyphenyläthylamin[2]) erhalten worden ist.

Die biochemische Umwandlung des Hordenins durch die genannten Mikroorganismen kann also nur derartig verlaufen sein, daß unter Wasseranlagerung und Desamidierung der Dimethylamidogruppe sich der entsprechende p-Oxyphenyläthylalkohol zufolge der Gleichung gebildet hat:

$$HO\langle\quad\rangle CH_2.CH_2.N(CH_3)_2 + H_2O$$

Hordenin

$$= HO\langle\quad\rangle CH_2.CH_2OH + NH(CH_3)_2$$

Tyrosol

Das in dieser Gleichung erscheinende Dimethylamin war nach Beendigung der Versuche in der Nährflüssigkeit in keinem Falle nachweisbar. Dieser negative Befund kann indes nicht überraschen, wenn man in Betracht zieht, daß auch bei der Vergärung von Aminosäuren sich in der vergorenen Lösung das primär abgespaltene Ammoniak nicht auffinden läßt, weil es sofort von den Pilzen zu Eiweiß verarbeitet wird und daher in statu nascendi aus der Flüssigkeit verschwindet. Wie auch aus früheren Untersuchungen[3]) am Betain zu folgern ist, muß

[1]) F. Ehrlich, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **40**, 1047, 1907; **44**, 139, 1911.

[2]) F. Ehrlich und P. Pistschimuka, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**, 1006, 1912.

[3]) F. Ehrlich und F. Lange, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **46**, 2746, 1913; Zeitschr. Ver. Deutsch. Zuckerind. **64**, 158, 1914.

man annehmen, daß das intermediär aus Hordenin hervorgegangene Dimethylamin sich unter Wasseraufnahme spaltet:

$$NH(CH_3)_2 + H_2O = NH_3 + 2\,CH_3OH,$$

und daß die dabei auftretenden Produkte, Ammoniak und Methylalkohol, die sich ebenfalls im Verlaufe der Vegetation nicht nachweisen lassen, wahrscheinlich nach weiterer Oxydation in irgend einer Weise im Stoffwechsel der Pilze verwertet worden sind.

Als bemerkenswertes Resultat dieser Versuche wäre noch hervorzuheben, daß eine verhältnismäßig so giftige Substanz wie Hordenin einen so günstigen Nährstoff für manche Mikroorganismen bildet, und daß das Wachstum von Pilzen darauf eine Art Entgiftung herbeiführt, indem aus der giftigen Base der ungiftige Alkohol Tyrosol hervorgeht[1]).

Kulturversuche mit Penicillium glaucum zeigten ebenfalls kräftiges Wachstum dieses Pilzes auf Hordeninlösungen, doch ließ sich kein kristallisiertes Abbauprodukt aus dem Nährsubstrat isolieren. Immerhin war der Nachweis zu führen, daß in diesen Versuchen Tyrosol nur in Spuren, vielleicht als Ester auftritt, während aus dem größeren Teil der Base eine in Äther lösliche die Millonsche Reaktion gebende ölige Säure entsteht, die sich von anderen sirupösen Verbindungen und der nebenher entstandenen Bernsteinsäure nicht trennen ließ. Vielleicht ist hier durch weitergehende Oxydation die p-Oxyphenylessigsäure entstanden. Bei länger dauerndem Wachstum zeigte sich, daß die die Millonsche Reaktion gebende Säure nur noch in Spuren nachweisbar war, so daß also anzunehmen ist, daß auch der Benzolkern im Hordenin schließlich eine Sprengung durch den Pilz erfahren hat, ähnlich wie dies F. Ehrlich und K. A. Jacobsen[2]) bei Kulturversuchen von Penicillium glaucum auf Tyrosin beobachtet haben.

Von den Schlußfolgerungen, die aus den vorliegenden und den früheren Versuchsresultaten zu ziehen sind, dürfte in

---

[1]) Wie die Herren Geh. Rat J. Pohl und Prof. J. Biberfeld im hiesigen Pharmakologischen Institut auf meine Bitte bereits vor längerer Zeit festgestellt haben, ist Tyrosol auch in größeren Dosen eine für den tierischen Organismus indifferente Substanz.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 44, 888, 1911.

biochemischer Hinsicht namentlich die Eindeutigkeit interessant erscheinen, mit der in ganz heterogen zusammengesetzten organischen Stickstoffverbindungen, wie primären, sekundären und tertiären Aminen, normalen und trimethylierten Aminosäuren, durch manche Arten von Mikroorganismen regelmäßig und in zahlreichen Fällen fast quantitativ ein Ersatz der Stickstoffgruppe durch die Hydroxylgruppe erfolgt. Zweifellos werden sich solche biochemischen Reaktionen noch in verschiedenster Richtung variieren lassen und ähnlich, wie jetzt zur präparativen Darstellung von manchen sonst schwer zugänglichen Alkoholen mittels Hefe und von Oxysäuren mittels Oidium lactis, wird man die schonend abbauende Wirkung vieler Mikroorganismen noch für die Gewinnung und vielleicht auch für die Konstitutionsaufklärung mancher anderen organischen Substanzen vorteilhaft verwerten können.

Vom pflanzenphysiologischen Standpunkt aus verdient Beachtung, daß außer Aminosäuren und primären Aminen auch methylierte Amine in vielen Fällen zur normalen Plasmabildung von Mikroorganismen ausgenutzt werden. Es wirft dies vielleicht ein Licht auf die Frage, ob die in den grünen Pflanzen auftretenden Alkaloide, die ja an Alkylamingruppen reich sind, Endprodukte des Stoffwechsels der Pflanzen darstellen oder Zwischenprodukte, die im Leben der Pflanzen noch weiteren biochemischen Umwandlungen unterliegen. Adrenalin und Hordenin sind ja noch mehr wie das Betain basische Verbindungen, die man chemisch und physiologisch als den Alkaloiden nahestehend bezeichnen kann. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß auch in der wachsenden grünen Pflanze infolge ähnlicher Vorgänge, wie sie sich bei der Vegetation von Hefen und Schimmelpilzen abspielen, das ursprünglich vermutlich aus dem Tyrosin über das Tyrosol hervorgegangene Hordenin[1]) wieder in das Tyrosol zurückverwandelt

$$HO\langle\bigcirc\rangle CH_2 . CH(NH_2) . CO_2H$$

$$\longrightarrow HO\langle\bigcirc\rangle CH_2 . CH_2OH \overset{\longleftarrow}{\longrightarrow} HO\langle\bigcirc\rangle CH_2 . CH_2 . N(CH_3)_2$$

[1]) F. Ehrlich und P. Pistschimuka, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 45, 2428, 1912.

und damit wieder anderen Stoffwechselprozessen nutzbar gemacht wird. Das Gleiche gilt für die Beziehungen des Betains zur Glykolsäure in der Zuckerrübe[1]).

Experimenteller Teil

nach Versuchen von Fritz Lange[2]).

Adrenalin[3]).

Versuch 1.

0,1 g Adrenalin wurde zusammen mit 0,06 g KH_2PO_4, 0,02 g $MgSO_4 + 7H_2O$, 0,02 g NaCl nebst minimalen Spuren $FeSO_4$ und einigen Kubikzentimetern verdünnter Essigsäure in 200 ccm Wasser gelöst. Nach der Sterilisation wurden zu der gegen Lakmus ganz schwach sauer reagierenden Lösung, die sich während des Kochens dunkelbraun gefärbt hatte, vorsichtig 3 ccm Äthylalkohol zugesetzt und die Flüssigkeit mit Willia anomala Hansen beimpft. Das Wachstum war zwar dauernd schwach, doch hatte sich nach 8 Wochen immerhin 0,01 g Hefetrockensubstanz mit 0,0014 g N gebildet. Die mikroskopische Kontrolle ergab nach dieser Zeit fast ausnahmslos lebende Zellen, die sehr vakuolenreich waren.

Versuch 2.

Zu einer sterilen Lösung von 5 g Saccharose neben 0,3 g KH_2PO_4, 0,1 g $MgSO_4 + 7H_2O$, 0,1 g NaCl ohne Zusatz von $FeSO_4$ in 1 Liter Wasser wurde mittels Filtration durch eine sterile Chamberlandkerze eine kalt bereitete essigsaure Lösung von 0,5 g Adrenalinoxalat zugesetzt und die vollkommen ungefärbte Versuchslösung mit Willia anomala Hansen beimpft. Die Hefe wuchs anfangs unter Bildung einer zarten

---

[1]) F. Ehrlich und F. Lange, Zeitschr. Ver. Deutsch. Zuckerind. 64, 158, 1914.

[2]) Inaugural-Dissertation. Breslau 1914.

[3]) Die Adrenalinpräparate wurden uns für die Versuche freundlichst von Herrn Geh. Rat Prof. Gadamer zur Verfügung gestellt, wofür ich auch an dieser Stelle verbindlichst danke.

Kahmhaut deutlich weiter. Nach einigen Wochen trat jedoch eine merkbare Hemmung ein, so daß der Versuch nach 2 Monaten abgebrochen wurde. In dieser Zeit hatte sich 0,15 g Hefetrockensubstanz mit 0,0069 g N gebildet. Die Gesamtacidität des Filtrats entsprach verbrauchten 6 ccm $^{n}/_{1}$ NaOH. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade vorsichtig zum Sirup eingedampft und dieser nach dem Ansäuern mit 10 $^{0}/_{0}$ iger Schwefelsäure ausgeäthert. Nach dem Verdunsten des mit geglühtem Natriumsulfat getrockneten Ätherauszuges blieb ein sauer reagierendes braunes, zum Teil verharztes Öl (0,05 g) zurück, mit dessen wasserlöslichem Anteil parallel mit einer frisch hergestellten Adrenalinlösung die folgenden Reaktionen angestellt wurden. Mit Eisenchlorid entstand eine olivgrüne beständige Färbung, während die mit der Adrenalinlösung angestellte Reaktion eine anfangs blaue, bald grün und schließlich rötlichbraun werdende Färbung ergab. In beiden Fällen wurde Fehlingsche Lösung und ammoniakalische Silberlösung stark reduziert, die letztere bereits in der Kälte.

Versuch 3.

0,1 g Adrenalin wurde mit den üblichen Nährsalzen und etwas Essigsäure in 200 ccm Wasser gelöst und nach der Sterilisation vorsichtig mit 3 ccm Alkohol versetzt. Die Reaktion gegen Lakmus war schwach sauer. Der mit Oidium lactis beimpfte Versuch zeigte wie bei Willia anomala nur ein mäßiges Wachstum. Nach 2 Monaten hatte sich 0,01 g Pilztrockensubstanz mit 0,0015 g N gebildet. Die mikroskopische Kontrolle ergab meist lebende Zellen mit stark gekörntem Inhalt, was also auf einen gewissen Hungerzustand des Pilzes hindeutete.

Versuch 4.

Eine wie in Versuch 2 hergestellte Nährlösung, die im Liter 0,4 g Adrenalin und 4 g Invertzucker enthielt, wurde mit Penicillium glaucum beimpft. Die Vegetation machte im Anfang nur mäßige Fortschritte, da der Pilz submers wuchs. Nach 11monatlichem Stehen des Versuches hatte sich aber allmählich eine ziemlich starke Pilzdecke gebildet, deren Trockengewicht 1,18 g betrug und die 0,0126 g N enthielt, was 0,16 g

assimiliertem Adrenalin, also fast der Hälfte der angewandten Substanz entsprechen würde. Irgendwelche Abbauprodukte des Adrenalins ließen sich aus der Flüssigkeit nicht isolieren.

Versuch 5.

Eine Nährlösung, die 0,2 g Adrenalin und 4 g Invertzucker in 200 ccm Wasser gelöst enthielt, wurde der freiwilligen Infektion überlassen. Nach kurzer Zeit siedelten sich Bakterien und Schimmelpilze an, die bald die gesamte Nährlösung mit einem schwärzlichen Mycel erfüllten, das nach 12monatlichem Stehen 0,84 g Trockensubstanz mit 0,0133 g N lieferte, entsprechend 0,17 g assimiliertem Adrenalin. Danach war also der größte Teil des Stickstoffs der Base von den Mikroorganismen verbraucht worden.

Hordenin.

Das für die Kulturversuche verwendete Hordenin wurde aus getrockneten Malzkeimen nach einem gegenüber den früheren etwas vereinfachten Verfahren dargestellt. Die gedarrten Malzkeime waren frisch von der Breslauer Aktien-Malzfabrik bezogen. Sie stammten von einem wenig gedarrten „Pilsener Malz".

3 kg Malzkeime wurden in engmaschig gestrickten wollenen Beuteln mit kochendem Wasser erschöpfend extrahiert. Die gesammelten Filtrate wurden über freier Flamme, zuletzt auf dem Wasserbade bis zum Sirup eingedampft, dieser mit dem 2- bis 3fachen Volumen 96$^0/_0$igem Alkohol verrührt und der hierbei ausfallende, zum Teil aus Eiweißstoffen bestehende Niederschlag nach etwa einstündigem Stehen abfiltriert. Das vollständig klare, goldgelbe Filtrat wurde durch Destillation vom Alkohol befreit, dessen letzte Spuren durch mehrmaliges Abdampfen des zurückbleibenden Sirups mit Wasser entfernt wurden. Zur Gewinnung des Hordenins wurde dieser Sirup nunmehr mit Soda schwach alkalisch gemacht und erschöpfend mit Äther extrahiert. Beim Verdampfen der ätherischen Auszüge krystallisierte sofort fast reines Hordenin aus, das aus Wasser unter Zusatz von Blutkohle umkrystallisiert wurde. Die

so erhaltenen Präparate schmolzen bei 117 bis 118°. Die Gesamtausbeute betrug etwa 12 g Rohprodukt bzw. 10 g reines Hordenin.

Versuch 1.

1 g Hordenin wurde unter Zugabe von 10 g Saccharose, 0,3 g KH_2PO_4, 0,1 g $MgSO_4 + 7 H_2O$, 0,1 g NaCl und Spuren $FeSO_4$ in 1 Liter Wasser gelöst und mit Phosphorsäure neutralisiert. Die Reaktion der Nährlösung war vor dem Versuch gegen Lakmus schwach sauer. Nach dreimaliger sorgfältiger Sterilisation wurde der Kolben mit der Heferasse Willia anomala Hansen beimpft. Das anfangs mäßige Wachstum wurde schon nach wenigen Tagen sehr intensiv, was äußerlich durch die Bildung einer starken für diese Hefeart charakteristischen Kahmhaut zum Ausdruck kam. Als nach 12 Wochen ein Stillstand in der Vegetation eingetreten zu sein schien, wurde der Versuch abgebrochen und die entstandene Hefe durch ein gewogenes Filter von der Flüssigkeit abgetrennt. Die bei 105° getrocknete Hefesubstanz wog 0,52 g und enthielt 0,0207 g N nach Kjeldahl. Die Gesamtacidität des Filtrats entsprach verbrauchten 17 ccm $^n/_1$-NaOH gegen Phenolphtalein. Die stark nach Essigester riechende Lösung, in der mit Nesslerschem Reagens keine Spur freies Ammoniak und Dimethylamin nachweisbar war, wurde auf dem Wasserbade zum Sirup eingedampft, dieser mit Schwefelsäure deutlich angesäuert und etwa 20 Stunden ausgeäthert. Der hierbei erhaltene Extrakt, der also frei von Hordenin war, wurde mit Natriumbicarbonat gegen Lakmus alkalisch gemacht und wiederum erschöpfend ausgeäthert. Der mit geglühtem Natriumsulfat getrocknete Ätherextrakt lieferte beim Verdampfen 0,22 g fast reines Tyrosol vom Schmelzpunkt 92°, das für die Analyse noch aus Chloroform umkrystallisiert wurde. Im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet ließ sich schließlich 0,13 g vollkommen reines Tyrosol vom richtigen Schmelzpunkt 93° gewinnen.

0,1262 g Sbst. 0,3215 g CO_2; 0,0831 g H_2O.

$C_8H_{10}O_2$ (mol 138) Ber. C 69,56; H 7,25

Gef. „ 69,48; „ 7,37.

Versuch 2.

Eine sterile Lösung von 0,9 g Hordenin, 20 g Invertzucker und den üblichen anorganischen Nährsalzen in 1 l Wasser, deren Alkalität durch Phosphorsäure bis zur schwach sauren Reaktion gegen Lakmus abgestumpft war, wurde mit der Heferasse Willia anomala Hansen beimpft. Nach 3 monatlichem guten Wachstum hatte sich in dem wie oben verarbeiteten Versuch 0,64 g Hefetrockensubstanz mit 0,0223 g N gebildet. Auch hier konnte in dem stark nach Essigester riechenden Filtrat kein Ammoniak und Dimethylamin nachgewiesen werden. Die in derselben Weise vorgenommene Ätherextraktion der zum Sirup eingedampften Lösung ergab 0,24 g ziemlich reines Tyrosol, das nach dem Umkrystallisieren aus Chloroform scharf bei 93° schmolz.

Versuch 3.

1 g Hordenin wurde zusammen mit den üblichen anorganischen Nährsalzen und der zur Neutralisation nötigen Phosphorsäure in 1 l Wasser gelöst, sterilisiert und darauf vorsichtig mit 10 ccm Alkohol versetzt. Nunmehr wurde die Lösung mit einer Reinkultur von Oidium lactis, das aus Milch gezüchtet war, beimpft. Das Wachstum war zuerst mäßig, wurde jedoch nach einer Woche kräftiger, so daß sich bald eine vollständige Pilzdecke gebildet hatte. Die Dauer des Versuches betrug vier Monate. In dieser Zeit waren 0,65 g Pilztrockensubstanz mit 0,0344 g Stickstoff entstanden. Die Gesamt-Acidität des Filtrats, in dem keine Spur Ammoniak und Dimethylamin nachgewiesen werden konnte, entsprach verbrauchten 7 ccm $^{n}/_{1}$-NaOH gegen Phenolphtalein. Die in der üblichen Weise aufgearbeitete Lösung ergab bei der Ätherextraktion 0,40 g Tyrosol, das zur Analyse 2 mal aus Chloroform umkrystallisiert und im Vakuum getrocknet den richtigen Schmelzpunkt von 93° zeigte.

0,1249 g Sbst. 0,3172 g CO_2 : 0,0810 g H_2O.

$C_8H_{10}O_2$ (mol 138). Ber.: C: 69,56; H: 7,25.

Gef.: „ 69,26; „ 7,26.

Versuch 4.

Eine wie früher bereitete Lösung von 0,5 g Hordenin und 20 g Invertzucker in 1 l Wasser, deren Reaktion mit Phosphorsäure gegen Lakmus schwach sauer gemacht war, wurde mit einer Reinkultur von Penicillium glaucum beimpft. Bereits nach wenigen Tagen bildete sich eine zarte Pilzdecke, die ständig zunahm und bald die gesamte Nährlösung mit Mycel erfüllte. Bemerkenswert war, daß sich während des ganzen Wachstums keine Sporen bildeten und die an der Oberfläche rein weiße Pilzdecke an der Unterseite allmählich eine braunrote Färbung annahm. Der nach einem Monat abgebrochene Versuch wurde in der üblichen Weise aufgearbeitet. Es war in dieser Zeit 1,2 g Pilztrockensubstanz mit 0,0378 g N entstanden. Die Gesamt-Acidität des Filtrats entsprach verbrauchten 23 ccm $^{n}/_{1}$-NaOH. Mit Nesslers Reagens war kein Ammoniak und Dimethylamin nachweisbar. Der durch Extraktion in saurer Lösung erhaltene Ätherauszug des zum Sirup eingedampften Filtrats lieferte nach dem Verdampfen des Äthers auf Ton gestrichen 0,33 g eines gelblichen Krystallgemisches, das zunächst auf Tyrosol geprüft wurde. Eine damit in bicarbonatalkalischer Lösung vorgenommene Äther-Extraktion lieferte nur sehr wenig Sirup (0,02 g) mit starker Millonscher Reaktion, so daß es nicht ausgeschlossen ist, daß geringe Mengen Tyrosol vielleicht in Esterform vorlagen, die durch irgendwelche Stoffe an der Krystallisation gehindert wurden. Ebensowenig war aus dem Ätherextrakt der angesäuerten Flüssigkeit, auch nicht nach 4stündigem Kochen mit 10$^{0}/_{0}$iger Natronlauge, Tyrosol zu isolieren. Die verseifte Lösung lieferte nach dem Ansäuern von neuem mit Äther extrahiert nur etwa 0,2 g einer krystallinischen sauer reagierenden Substanz vom Schmelzpunkt 150 bis 152^{0}, die hauptsächlich aus Bernsteinsäure bestand und nebenbei eine die Millonsche Reaktion gebende Säure, vermutlich die bei 148^{0} schmelzende *p*-Oxyphenylessigsäure, zu enthalten schien. Eine Abtrennung dieser Verbindung gelang indes nicht.

Versuch 5.

Eine sterile Lösung von 1 g Hordenin und den üblichen anorganischen Nährsalzen in 1 l Wasser wurde nach vor-

sichtigem Zusatz von 15 ccm Alkohol mit Penicillium glaucum beimpft. Nach 4 monatlichem Stehen hatte sich 2,6 g Pilztrockensubstanz mit 0,0724 g N gebildet. Die Gesamt-Acidität des von Ammoniak- und Dimethylamin freien Filtrats entsprach 13 ccm $^{n}/_{1}$-NaOH. Auch hier konnten keine bestimmten Abbauprodukte gefaßt werden. Die Ätherextraktion in saurer Lösung lieferte nur sehr wenig Sirup (0,01 g), der teilweise krystallisierte und schwache Millonsche Reaktion gab. Hordenin als solches war nicht mehr nachweisbar.

Berichtigung.

In Band 74, S. 276 muß es auf der vorletzten und drittletzten Textzeile von unten heißen:

geringer statt höher.

Autorenverzeichnis.



